

**POSTTRANSLATIONALE MODIFIZIERUNG
UND INTRAZELLULÄRER TRANSPORT DES
CONTACT SITE A GLYKOPROTEINS VON
DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM**

Hans-Peter Hohmann

Posttranslationale Modifizierung
und intrazellulärer Transport des
Contact Site A Glykoproteins von
Dictyostelium discoideum

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwigs-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Hans-Peter Hohmann
München 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Oesterheld

Tag der mündlichen Prüfung: 23. 2. 1987

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde bereits
veröffentlicht:

Hans-Peter Hohmann, Günther Gerisch, Raymond W. H. Lee
und Wieland B. Huttner

"Cell-free Sulfation of the Contact Site A Glycoprotein of
Dictyostelium discoideum and of a Partially Glycosylated
Precursor"

Journal of Biological Chemistry (1985) 260, 13869-13878

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1983 bis September 1986 auf Anregung und unter Leitung von Prof. Dr. G. Gerisch am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführt.

Herrn Prof. Gerisch danke ich sehr herzlich für sein großes Interesse an meiner Arbeit, seine Ratschläge und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. B. Huttner und Herrn Dr. S. Bozzaro für die vielen hilfreichen Gespräche, die sehr wertvoll für den Fortgang der Arbeit waren.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. D. Oesterhelt für die Vertretung meiner Arbeit vor der Fakultät.

Mein Dank gilt Herrn Dr. J. Stadler, Frau B. Fichtner und Frau D. Rieger für die Herstellung ¹²⁵J-markierter monoklonaler Antikörper und Herrn Prof. Dr. K. Hannig, in dessen Abteilung ich die trägerfreie Elektrophorese durchführen konnte. Mein Dank gilt ebenso Frau Dr. Wallraff, Herrn Dr. M. Yoshida und Herrn Dr. W. F. Loomis, die mir freundlicherweise die Mutantenstämme zur Verfügung stellten.

Bei Regine bedanke ich mich für die Mithilfe bei der Textverarbeitung und beim Anfertigen der Figuren.

Für die gute Arbeitsatmosphäre sei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Zellbiologie herzlich gedankt.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
EINLEITUNG	4
MATERIAL UND METHODEN	20
ERGEBNISSE	
DIE GLYKOSYLIERUNG DER CSA-POLYPEPTIDKETTE	
Identifizierung einer Vorstufe des CSA-Glykoproteins	38
Durch unterschiedliche Glykosylierung entstehen vier verschiedene CSA-Formen	42
Die Bindung der Kohlenhydrate an die CSA-Polypeptidkette	56
Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse	61
DIE SULFATIERUNG DES CSA-GLYKOPROTEINS	
Das 80 kDa CSA-Glykoprotein und seine 68 kDa Vorstufe können zellfrei sulfatiert werden	63
Verteilung der 68 kDa Vorstufe, des 80 kDa Glykoproteins und der Sulfatierungskapazität in Membranfraktionen	67

Der größte Teil der 68 kDa Vorstufe liegt in der Zelle 77
in nicht sulfatierter Form vor

Die 68 kDa CSA-Form der Mutante HL220 unterscheidet 80
sich von der 68 kDa CSA-Vorstufe des Wildtyps durch
einen höheren Grad der Sulfatierung

DER EINFLUSS DER TYP1 UND TYP2 KOHLENHYDRATE AUF DEN INTRAZELLULÄREN TRANSPORT UND DIE STABILITÄT DER CSA

In Wildtypzellen ist das 80 kDa Glykoprotein und in 86
Tunicamycin-behandelten Zellen das 66 kDa Glykoprotein,
aber nicht das 53 kDa Protein in einer mit Plasma-
membranen angereicherten Saccharosegradientenfraction
akkumuliert.

Die Verteilung der verschiedenen CSA-Formen zwischen 91
Zellinnerem und Zelloberfläche in unbehandelten und
in Tunicamycin-behandelten Wildtypzellen

Der Transport der 68 kDa CSA-Form in den Mutanten 96
HG220 und HG701

Abbauprodukte der 68 kDa und 53 kDa Formen akkumulie- 100
ren im Medium unbehandelter und Tunicamycin-behandelter
Zellen der Mutante HG220

DISKUSSION	106
ANHANG	128
Versuche zur Optimierung der zellfreien Sulfatierungs- reaktion: A. Abhängigkeit der zellfreien Sulfatierungs- reaktion von divalenten Kationen, der Reaktionstem- peratur und der PAPS-Konzentration	129
B. Abhängigkeit der zellfreien Sulfatierungs- reaktion von der Reaktionszeit	129
C. Das Cosubstrat PAPS wird während der zell- freien Sulfatierungsreaktion hydrolysiert	131
Die für die endogene Sulfatierung verantwortlichen Komponenten können solubilisiert werden	132
Änderung der zellfreien Sulfatierung während der Entwicklung	134
Versuche zur Selektion von Mutanten mit Sulfatierungs- defekten: A. Abschätzung des Beitrages zur Oberflächen- ladung, der von den Sulfatresten der CSA geleistet wird	136
B. Anreicherung von Mutanten, die eine reduzierte Oberflächenladung besitzen	139
C. Untersuchung von Klonen mutagenisierter Wildtypzellen auf Sulfatierungsdefekte durch "Colonyblot"-Technik	142

Inhibition der Sulfatierung des CSA-Glykoproteins durch Selenat- und Chlorationen und reduzierte Sulfatierung in der Mutante HG702 144

Die Sulfatierung ist die Ursache für die isoelektrische Inhomogenität des CSA-Glykoproteins 152

Die Sulfatierung ist nicht die Ursache der Endoglykosidaseresistenz der Typl Kohlenhydrate in der 80 kDa CSA-Form 154

Das 68 kDa Glykoprotein ist nicht identisch mit einem anderen, dem CSA-Glykoprotein immunologisch verwandten 68 kDa Zelladhäsionsmolekül 156

LITERATUR 158

ABKÜRZUNGEN

ConA	Concanavalin A
CSA	contact sites A
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fab	Antigen-bindendes Fragment
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
Gluc	Glukose
Hepes	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'- Äthansulfonyl-säure
mAk	monoklonaler Antikörper
Man	Mannose
MNNG	1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
2D-PAGE	zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese

PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat
PMSF	Phenylmethysulfonyl Fluorid
PPO	2,5-Diphenyloxaxol
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
SDS	Natriumdodekylsulfat
WGA	Weizenkeimaggluthinin

ZUSAMMENFASSUNG

Das Contact Site A Glykoprotein vermittelt die EDTA-stabile Zelladhäsion in dem zellulären Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*. Dieses Protein hat ein apparentes Molekulargewicht von 80 kDa und besitzt zwei Typen von Kohlenhydraten. Typ1 Kohlenhydrat ist sulfatiert und bindet an Concanavalin A, ein Lektin, das vorwiegend mit -Mannose und -Glukose reagiert. Typ2 Kohlenhydrat ist unsulfatiert, bindet an Weizenkeim-Agglutinin, ein für N-Acetylglukosamin spezifisches Lektin, und enthält Erkennungsstellen für eine Reihe monoklonaler Antikörper, die gegen das CSA Glykoprotein gerichtet sind.

Das apparente Molekulargewicht des unglykosylierten CSA-Proteins beträgt 53 kDa. Die Modifizierung mit Typ1 Kohlenhydrat erfolgt cotranslational im rauen endoplasmatischen Retikulum und führt zu einer 68 kDa Vorstufe. In einem zweiten, vom ersten unabhängigen Glykosylierungsschritt, der posttranslational im Golgiapparat stattfindet, wird Typ2 Kohlenhydrat auf die 68 kDa CSA Vorstufe übertragen, wodurch sich das apparente Molekulargewicht auf 80 kDa, den Wert des reifen CSA-Glykoproteins, erhöht. Dies konnte durch Pulse/Chase-Markierung gezeigt werden.

Typ1 Kohlenhydrate sind N-glykosidisch an die Polypeptidkette gebunden. Die Art der Bindung der Typ2 Kohlenhydrate konnte nicht eindeutig ermittelt werden. Im Golgiapparat werden die cotranslational übertragenen Typ1 Kohlenhydrate modifiziert. Sie werden resistent gegen die

Endoglykosidasen H und F, verlieren Bindestellen für Concanavalin A und werden sulfatiert.

In einem Homogenat aggregationsfähiger *D.discoideum* Zellen sind Sulfotransferasen vorhanden, die die Übertragung des Sulfatrestes von PAPS auf endogene Akzeptoren, darunter das CSA-Glykoprotein, katalysieren. Dies konnte in einem zellfreien Sulfatierungssystem gezeigt werden.

Tunicamycin, ein Inhibitor der N-Glykosylierung, verhindert die Modifizierung der CSA-Polypeptidkette mit den Typ1 Kohlenhydraten. Anstelle der 68 kDa Vorstufe wird in Tunicamycin-behandelten Zellen eine 53 kDa Form synthetisiert. Deren Glykosylierung mit Typ2 Kohlenhydrat führt zu einer 66 kDa Form, wie ebenfalls durch Pulse/Chase-Markierung gezeigt wurde. Dieses Glykoprotein ist das Endprodukt der CSA-Synthesekette in Tunicamycin-behandelten Zellen.

Die Modifikation des CSA-Proteins mit Typ2 Kohlenhydrat ist in bestimmten Mutanten gestört. Das im Wildtyp nur als Vorstufe existierende 68 kDa Glykoprotein ist daher in diesen Mutanten die einzige nachweisbare CSA-Form.

Nach längerer Einwirkung auf die Zellen verhindert Tunicamycin neben der cotranslationalen Glykosylierung mit Typ1 Kohlenhydrat auch die posttranslationale Übertragung von Typ2 Kohlenhydrat. Unter diesen Bedingungen endet die Synthese mit der 53 kDa Form, die weder mit Typ1 noch mit Typ2 Kohlenhydrat modifiziert ist.

Unabhängig von der Modifizierung mit Typ1 Kohlenhydrat wird das CSA-Protein zur Zelloberfläche transportiert. Dagegen führt die Hemmung der Glykosylierung mit Typ1 und Typ2 Kohlenhydrat zur Akkumulation des CSA-Proteins im Inneren der Zellen. Dies wurde durch Antikörperbindung an intakte, Tunicamycin-behandelte Zellen und anschließende Immunpräzipitation des solubilisierten nur Typ2 Kohlenhydrat enthaltenden 66 kDa Glykoproteins, aber nicht des unglykosylierten 53 kDa Proteins gezeigt.

In den Zellen der oben erwähnten Mutanten ist das nur mit Typ1 Kohlenhydrat modifizierte 68 kDa Glykoprotein zum geringen Teil auf der Zelloberfläche vorhanden. Es ist im Medium in degradiert Form akkumuliert. Anders als im Wildtyp sind proteolytisch degradierte Formen des 53 kDa Proteins im Medium Tunicamycin-behandelter Mutanten in erheblichem Ausmaß vorhanden. Dies deutet darauf hin, daß in diesen Zellen ein Mechanismus gestört ist, der das unglykosylierte 53 kDa CSA-Protein im Innern der Wildtypzellen zurückhält.

E I N L E I T U N G

Im Verband eines vielzelligen Organismus haften - von wenigen Ausnahmen abgesehen - die Zellen aneinander oder an extrazellulären Strukturen, wobei spezifische Adhäsionsmechanismen beteiligt sind. Bei Pflanzen sind aneinander haftende Zellen in der Regel durch Zellwände getrennt, in tierischen Organismen kann die Adhäsion durch unmittelbaren Membran-Membran-Kontakt erfolgen oder durch eine extrazelluläre Matrix vermittelt werden. Oft verstärken spezielle Differenzierungen der Zellmembranen die Verbindungen der Zellen. Hierzu gehören die "gap junctions" der Epitelzellen. Interaktionen von Zellen mit Matrixkomponenten wie Fibronektin oder Laminin werden durch spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermittelt.

Es muß sichergestellt sein, daß die Zellen sich untereinander erkennen, so daß es beim Aufbau eines Gewebes nicht zu einer zufälligen Mischung der verschiedenen Zelltypen kommt, sondern daß geordnete Strukturen entstehen. Man kann ungeordnete Mischungen von Zellen künstlich herstellen, indem man Zellverbände in Einzelzellen dissoziiert. Dies wurde in einem klassischen Experiment von H.V. Wilson (1907) bei Schwämmen, die zu den einfachsten multizellulären Organismen gehören, durch mechanisches Zerkleinern bewirkt. Wurden auf diese Weise Suspensionen von Einzelzellen hergestellt, die aus zwei unterschiedlich gefärbten Schwammarten stammten, lagerten sich nach Mischung der Zellen bevorzugt artgleiche Zellen aneinander. So

entstanden zwei Typen von Zellaggregaten, die sich durch unterschiedliche Färbung voneinander unterschieden. Dieses Experiment zeigte erstmalig, daß Zellen aufgrund der Affinitäten ihrer Oberflächen artgleich und artfremd unterscheiden können.

Der Adhäsion liegt bei den Schwämmen ein artspezifischer Faktor zugrunde, der in aktiver Form durch Inkubation mit Ca^{2+} -freiem Seewasser von den Zellen abgetrennt werden kann (Humphrey, 1977; Burger und Jumblatt, 1977). Durch diese Behandlung zerfallen die Schwämme in Einzelzellen. Zur Reaggregation ist außer Ca^{2+} auch der in das Medium abgegebene Faktor notwendig. Die Reaggregation einer Schwammart erfolgt nicht, wenn der Aggregationsfaktor einer anderen Art zugesetzt wird.

Auch aus Geweben von Vertebraten lassen sich durch Trypsinisieren Suspensionen einzelner Zellen herstellen (Townes und Holtfreter, 1955; Moscona und Hausmann, 1977; Roth und Weston, 1967). Mischt man so gewonnene Zellen aus embryonalem Nieren- und Knorpelgewebe miteinander, so findet eine gemeinsame Reaggregation der Zellen statt. Dennoch ist die homotypische Bindung, d.h. die Bindung zwischen gleichen Zellen, gegenüber der heterotypischen Bindung, d.h. der Bindung zwischen ungleichen Zellen, bevorzugt. Dies äußert sich in der Aussonderung der Zellen innerhalb der Aggregate, die so erfolgt, daß die Knorpelzellen ein kompaktes Gewebe bilden, um das sich als einheitliche Schicht die Nierenzellen lagern. Auf der Oberfläche der Zellen müssen

also Marker vorhanden sein, die das Aussortieren der Zellen ihrer Gewebszugehörigkeit gemäß ermöglichen.

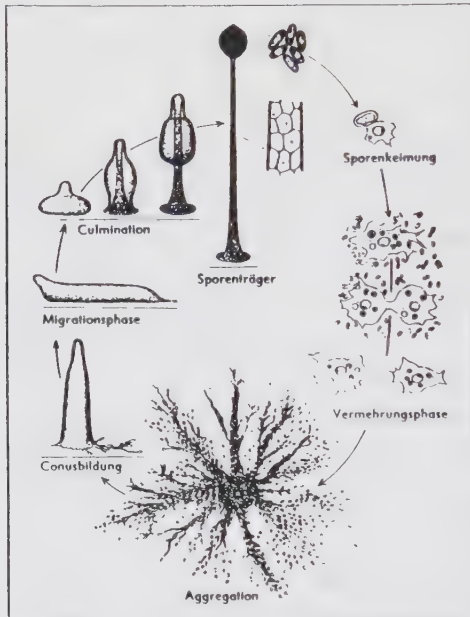


Fig.1 Entwicklungszyklus der kollektiven Amöbe *D. discoideum*

Die Entwicklung beginnt mit dem Keimen der Sporen, aus denen je eine Amöbe ausschlüpft (rechts oben). Die Amöben vermehren sich durch Zweiteilung, solange ihnen Bakterien als Nahrung zur Verfügung stehen. Nach dem Verbrauch der Bakterien ändern die Amöben ihr Verhalten: Sie verbinden sich und wandern zu Sammelzentren (Aggregation), in denen aus der Amöbenmasse ein polar gebauter Körper, der Conus, entsteht. Der Conus kann den Ort seiner Entstehung verlassen und auf dem Substrat entlangwandern (Migration), wobei er positiv phototaktisch reagiert. Während des letzten Entwicklungsabschnittes (Culmination) wandelt sich der Conus in einen Sporenträger um, wobei sich die Zellen seiner Spitzenregion zu vakuolisierten Stielzellen, die übrigen zu Sporen ausdifferenzieren. Die Stielzellen sterben ab, jede Spore aber kann einen neuen Entwicklungszyklus einleiten. (In der rechten Bildhälfte ist die Vergrößerung stärker gewählt als in den übrigen Teilen des Bildes. Aus: Gerisch, 1964)

Einfacher als in Vertebratenzellen läßt sich die Zelladhäsion in dem zellulären Schleimpilz *D.discoideum* studieren. Dieser Organismus vermehrt sich als Einzeller, wobei es nur zu losen Kontakten zwischen den amöboiden Zellen kommt. Erst nach einer Entwicklungsperiode, die durch Nahrungsentzug eingeleitet wird, lagern sich die Zellen zu einem gewebeartigen Verband, einem Aggregat, zusammen (Fig.1). Dies bietet für Experimente zwei Vorteile. Erstens, die Zellen sind von vornherein getrennt, ohne daß eine Dissoziation des Zellverbandes durch Trypsin notwendig ist, wobei Proteine auf der Zelloberfläche zerstört werden. Zweitens lassen sich durch die bei diesem Organismus ganz scharfe zeitliche Trennung zwischen Vermehrungs- und Aggregationsphase nicht aggregationsfähige und aggregationsfähige Zellen getrennt gewinnen und miteinander vergleichen.

Ein deutlicher Unterschied im Kontaktverhalten von Zellen in der Vermehrungs- und Aggregationsphase zeigt sich bei Zusatz von EDTA. Nur die aggregationsfähigen Zellen können sich zu größeren Gruppen zusammenlagern, wenn sie in Gegenwart des Chelatbildners in Suspension bewegt werden (Gerisch, 1961). Nur diese aggregationsfähigen Zellen besitzen die zum Aufbau eines geordneten Zellverbandes notwendigen artspezifischen Adhäsionsmechanismen. Mischt man nämlich unentwickelte, am Ende der Vermehrungsphase geerntete Zellen von *D.discoideum* mit denen einer verwandten Art, *Polysphondylium pallidum*, die einen ähnlichen Entwicklungszyklus wie *D.discoideum* durchläuft, findet man gleicherweise homotypische und heterotypische Bindungen

zwischen den Zellen. Nur aggregationsfähige Zellen bilden zusätzlich artspezifische Kontakte aus (Bozzaro und Gerisch, 1978).

Um die molekulare Basis der Zelladhäsion zu erforschen und Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) zu identifizieren, stützt man sich meistens auf immunologische Methoden. Ein Serum wird gegen gesamtes Zellhomogenat oder, da die Zelladhäsion ein Oberflächenphänomen ist, gegen Plasmamembranen hergestellt. Dieses Serum enthält unter anderem auch Antikörper, die sich gegen CAMs richten, diese inaktivieren und somit die Zelladhäsion verhindern. Da die Immunglobuline Zellen agglutinieren und Oberflächenantigene quervernetzen können und damit sekundäre Effekte wie "patching" und "capping" auslösen, werden aus den Antikörpern hergestellte univalente Antigen-bindende Fragmente (Fab's) als Inhibitoren der Zelladhäsion verwendet. Die zellulären Antigene, gegen die die inhibierenden Fab's gerichtet sind, werden identifiziert, indem die Zellbestandteile aufgetrennt und auf die Fähigkeit geprüft werden, diese Fab's zu neutralisieren.

Aggregationsfähige Zellen von *D.discoideum* sind gestreckt und bilden zwei Typen von Zellkontakten aus: B-Kontakte, die über die gesamte Zelloberfläche, also auch an den Längsseiten der Zellen gebildet werden, und A-Kontakte, die auf die Enden der Zellen beschränkt sind. Die letzteren zeichnen sich durch ihre EDTA-Stabilität aus (Beug et al., 1973). Mit Membranen aggregationsfähiger Zellen wurden,

um eine möglichst hohe Polyspezifität zu erhalten, 22 Kaninchen immunisiert. Fab's aus den vereinigten Seren blockierten A- und B-Kontakte (Fig.2). Wurden diese Fab's mit Zellen aus der Vermehrungsphase absorbiert, blockierten sie nur die A-Kontakte, wurden sie mit aggregationsfähigen Zellen absorbiert, blockierten sie weder A- noch B-Kontakte. Fab's, die gegen Zellen der Vermehrungsphase gerichtet waren, blockierten nur die B-Kontakte.

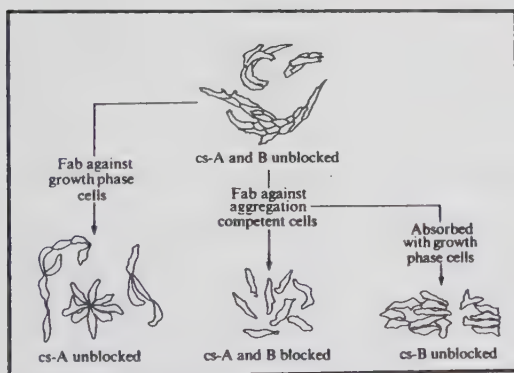


Fig.2 Immunologische Analyse des Zelladhäsionssystems in *D. discoideum*

Erklärung im Text (aus: Müller und Gerisch, 1978)

Contact sites A (CSA) sind definiert als Antigene, die die gegen A-Kontakte gerichteten Fab-Moleküle neutralisieren. Sinngemäß sind die contact sites B (CSB) definiert. Die CSA sind nach den eben geschilderten Experimenten entwicklungsreguliert und nur in aggregationsfähigen Zellen vorhanden. CSB werden nicht nur in aggregationsfähigen Zellen sondern bereits während der Vermehrungsphase gefunden.

Müller und Gerisch (1978, 1979) isolieren ein Protein aus Membranen aggregationsfähiger Zellen, das mit der CSA-Aktivität cofraktionierte. Dieses Protein besitzt ein apparentes Molekulargewicht von 80 kDa. Seine Identität mit den CSA wurde durch eine kürzlich isolierte *D. discoideum*-Mutante bestätigt. Diese Mutante durchläuft einen normalen Entwicklungszyklus, außer daß sie keine EDTA-stabilen Kontakte ausbildet. Ihr fehlt das 80 kDa Glykoprotein. Auch die entsprechende mRNA ist in der Mutante nicht vorhanden (Noegel et al., 1985).

Mit ähnlichen Methoden, wie sie zur Identifizierung der CSA geführt haben, wurden andere potentielle Zelladhäsionsmoleküle gefunden. Dazu gehört ein 95 kDa Protein von *D. discoideum*, das nach Aggregation in der Migrationsphase der Amöben gebildet wird (Steinemann und Parish, 1980) und für die Zelladhäsion in diesem Entwicklungsstadium verantwortlich gemacht wird. In Nervenzellen von Vögeln und Säugern wurde N-CAM (neural cell adhesion molecule) gefunden, das die gewebespezifische Interaktion in neuronalen

Retina- und Hirnzellen vermittelt (Edelman, 1983). In der Leber des Hühnerembryos wurde L-CAM (liver cell adhesion molecule) identifiziert (Gallin und Edelman, 1983). Uvomorulin aus EL-Zellen sorgt für den Zusammenhalt der Zellen des frühen Mausembryos (Hyafil et al., 1980). Proteine, die an der Zell-Substrat-Adhäsion beteiligt sind, wurden ebenfalls durch immunologische Methoden identifiziert. Eine Übersicht über die heute bekannten Zell-Substrat- und Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle in Vertebratenzellen findet sich in einem Review von Damsky und Mitarbeitern (1984).

Das CSA Protein aus *D.discoideum* wird posttranslational modifiziert. Es besteht zu 30% aus Kohlenhydraten, die als Zucker Mannose, N-Acetylglukosamin, Glukose und L-Fukose enthalten (Müller et al., 1979). Es ist an Serinresten phosphoryliert (Schmidt und Loomis, 1982; Coffman et al., 1981), acyliert durch Palmitinsäure (Stadler et al., 1984) und enthält Kohlenhydrat-gebundene Sulfatreste (Stadler et al., 1983).

Untersuchungen über die Rolle der Glykosylierung für die Zelladhäsion in *D.discoideum* wurden in verschiedenen Laboratorien mit Hilfe von Tunicamycin, einem Inhibitor der N-Glykosylierung (Takatsuki et al., 1971a; Takatsuki und Tamura, 1971b), durchgeführt. Übereinstimmend wurde eine Inhibition der EDTA-stabilen Kontakte gefunden (Ochiai et al., 1982b; Lam und Siu, 1982; Yamada et al., 1982; McDonald und Sampson, 1982). Lam und Siu berichten von einer

reduzierten Inkorporation von Fukose und Mannose, wenn sich die Zellen in Gegenwart von Tunicamycin entwickeln. Eine [^3H]Fukose-markierte Proteinbande bei 80 kDa war in den Tunicamycin-behandelten Zellen nicht nachzuweisen, während in Kontrollzellen diese den CSA zugeordnete Bande stark markiert war (Lam und Siu, 1982). Yamada et al. (1982) berichten von einer 70 kDa CSA-Form, die von Tunicamycin-behandelten Zellen anstelle des 80 kDa Glykoproteins gebildet wurde. Neben einer 66 kDa CSA-Form, die mit der 70 kDa Form der anderen Autoren identisch sein dürfte, fanden Ochiai und Mitarbeiter eine zweite CSA-Form bei 53 kDa in Tunicamycin-behandelten Zellen. Nur ein Teil der mAk's, die diese Autoren gegen die CSA herstellten, erkennen die 53 kDa Form, während die 66 kDa Form von allen ihren anti-CSA mAk's erkannt wird (Ochiai et al., 1982b).

In *D. discoideum* können Glykosylierungsdefekte nicht nur durch Tunicamycin-Behandlung erzeugt werden; sie finden sich auch in Mutanten (Murray et al., 1984; Yoshida, unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Mutanten aggregieren und produzieren Fruchtkörper. Sie bilden, wenn auch in geringerem Maße als der Wildtyp, EDTA-stabile Kontakte aus. Sie synthetisieren anstelle des 80 kDa Glykoproteins eine 68 kDa CSA-Form. Diese unterscheidet sich von dem von Ochiai und Mitarbeitern (1982b) gefundenen 66 kDa Produkt, das in Gegenwart von Tunicamycin gebildet wird, in seiner Reaktivität mit Antikörpern. Der Gehalt an 68 kDa CSA-Form in den Mutanten ist im Vergleich zum 80 kDa Glykoprotein des Wildtyps deutlich reduziert.

Die unvollständig glykosylierte CSA-Form der von Murray et al. (1984) isolierten Mutante HL220 hat ihre biologische Aktivität nicht verloren. Ihre geringe Menge in den Zellen korreliert mit der verminderten Fähigkeit der Mutantenzellen, EDTA-stabile Kontakte auszubilden. Die Inhibition der CSA-Glykosylierung durch Tunicamycin, die zu den oben genannten 66 kDa und 53 kDa Produkten führt, verhindert vollständig die Ausbildung EDTA-stabiler Kontakte.

Die Wirkung von Tunicamycin und von Inhibitoren der Kohlenhydrat-Prozessierung wie 2-Deoxyglukose, Swainsonin oder Deoxynojirimycin wurde in einer Reihe anderer Zellen untersucht. In einigen Fällen zeigte sich, daß die Glykosylierung eine wichtige Rolle für den intrazellulären Transport von membranständigen, lysosomalen und sekretorischen Proteinen spielt. Die Glykosylierung ist zum Beispiel notwendig zum Transport saurer Hydrolasen in die Lysosomen (Fisher et al., 1980; Neufeld und Ashwell, 1980; Tabas und Kornfeld, 1980), für den Transport von α_2 -Makroglobin, α_1 -Proteaseinhibitor und Ceruloplasmin einer menschlichen Hepatom-Zelllinie (Olden et al., 1985), zur Sekretion von Invertase und saurer Phosphatase in Hefe (Onishi et al., 1979; Ferro-Novick et al., 1984), für den Transport von Glykoproteinen der Zellhülle von Mausocyten (Roller et al., 1983) und zur Sekretion von IgA, IgE und IgM von Plasmacytomzellen der Maus (Melchers, 1973; Hickman und Kornfeld, 1978; Itoh und Kumagai, 1980; Sidman et al., 1981). Es gibt jedoch auch Beispiele, in denen fehlende N-Glykosylierung keinen Einfluß auf den Transport der

Proteine hatte (Herrler und Compans, 1983; Gilman et al., 1984; Havinga et al., 1984). Ein anderer oft beobachteter Effekt einer Hemmung der N-Glykosylierung ist die verstärkte proteolytische Degradation der Proteine (Loh und Grainer, 1978; Roller und Wassarman, 1983; Danielsen und Cowel, 1984).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Modifizierung des CSA-Proteins durch Kohlenhydrate und der Sulfatierung des glykosylierten Proteins, sowie mit den Auswirkungen einer Hemmung von Glykosylierungsschritten auf die Stabilität und den intrazellulären Transport des Proteins. Den Ergebnissen soll ein kurzer Überblick vorangestellt werden über den Kenntnisstand auf den Gebieten der Proteinglykosylierung und des Transportes von Proteinen zur Plasmamembran, in die Lysosomen und in das extrazelluläre Medium.

Eukaryontische Zellen sind nicht nur von einer Membran umschlossen, sondern auch von Membranen in Kompartimente unterteilt. Diese sind strukturell und funktionell verschieden, was hauptsächlich auf ihre unterschiedliche Proteinausstattung zurückzuführen ist. Die meisten Proteine werden im Cytoplasma synthetisiert. Für diese Proteine muß ein Transportsystem vorhanden sein, das sie vom Ort ihrer Synthese zu ihrem Zielkompartiment befördert. Dieser Transport ist hochspezifisch, so daß in die verschiedenen Kompartimente und in die sie umschließenden Membranen nur bestimmte Proteine gelangen.

Gut erforscht ist die ganz am Anfang der Transportkette stehende Unterscheidung zwischen cytoplasmatischen Proteinen und exoplasmatischen bzw. membranständigen Proteinen. Letztere enthalten nach der Signaltheorie von Blobel und Dobberstein (Blobel und Dobberstein, 1975; Walter und Blobel, 1981; Meyer et al., 1982) an ihrem N-Terminus eine Signalsequenz mit einer Länge von 16-26 Aminosäuren. Die Synthese dieses Sequenzabschnittes erfolgt an freien Ribosomen. Die Elongation der Polypeptidkette findet jedoch nur statt, wenn die Ribosomen an die Membran des ER gebunden sind. Die Bindung vermittelt ein die Signalsequenz erkennendes Protein (SRP, signal recognition protein) und ein in der ER-Membran verankerter SRP-Rezeptor (docking protein). Die Signalsequenz tritt durch die ER-Membran hindurch und die sich verlängernde Polypeptidkette gelangt ganz oder teilweise in das Lumen des ER. Proteine, die die Membran nur einmal durchspannen, besitzen ein "stop transfer" Signal, das die Translokation unterbricht und zu einem exoplasmatischen N-Terminus und einem cytoplasmatischen C-Terminus führt (Yost et al., 1983). Diese Membranorientierung besitzen zum Beispiel das Glykophorin und das G-Protein des Virus der vesikulären Stomatitis. Auch der N-Terminus des CSA-Glykoproteins ist exoplasmatisch, denn ein gegen die N-terminale Sequenz der CSA gerichtetes Serum bindet an die Oberfläche intakter aggregationskompetenter Zellen (West und Loomis, 1985).

Noch während der Translokation in das ER erfolgt in dessen Lumen der erste Schritt der Modifizierung der

Polypeptidkette durch N-Glykosylierung. Dabei wird eine Oligosaccharid-Vorstufe von einem Lipidcarrier auf die Polypeptidkette übertragen. In Zellen höherer Eukaryonten hat die Vorstufe die Struktur $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Gluc}_3$ (Fig.3), der Lipidcarrier ist das 11 Isoprenyleinheiten enthaltende Dolicholphosphat.

Die Oligosaccharidkette wird an Asparagin gebunden, jedoch nur wenn die übernächste Aminosäure in Richtung des C-Terminus Serin oder Threonin ist. Die Erkennungssequenz für Oligosaccharyltransferasen ist also Asn-X-Ser/Thr. X steht für alle Aminosäuren außer Prolin (Lehle und Bause, 1984; Marshall, 1972; Marshall, 1974). Diese Erkennungssequenz, die eine notwendige aber keine hinreichende Bedingung für N-Glykosylierung ist, findet sich fünfmal im CSA-Protein (Noegel et al., 1986).

Das auf die Polypeptidkette übertragene Oligosaccharid wird auf drei verschiedene Weisen prozessiert und dabei umgewandelt entweder in den "high mannose type", der neben den beiden basalen N-Acetylglukosaminresten nur aus Mannose besteht, in den "complex type", der Mannose, N-Acetylglukosamin, Fukose, Galaktose und Sialinsäuren enthalten kann, oder in den "hybrid type", der eine Mischung aus "complex type" und "high mannose type" darstellt. Diese Umwandlung beginnt im ER und wird im Golgiapparat abgeschlossen. In dem Schema der Fig.3, das einem Übersichtsartikel von R. und S. Kornfeld (1985) entnommen wurde, sind die einzelnen Reifungsschritte dargelegt.

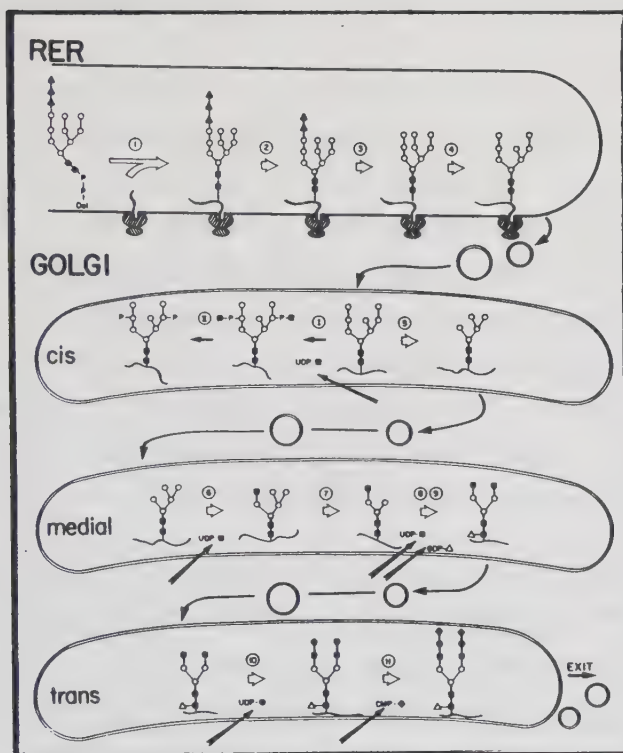


Fig.3 Die Modifizierung N-glykosidisch gebundener Oligosaccharide in neusynthetisierten Glykoproteinen

Die Reaktionen werden durch folgende Enzyme katalysiert: (1) Oligosaccharyltransferase, (2) α -Glukosidase I, (3) α -Glukosidase II, (4) ER α 1,2-Mannosidase, (I) N-Acetylglukosaminyolphosphotransferase, (II) N-Acetylglukosamin-1-Phosphodiester α -N-Acetylglukosaminidase, (5) Golgi α -Mannosidase I, (6) N-Acetylglukosaminyltransferase I, (7) Golgi α -Mannosidase II, (8) N-Acetylglukosaminyltransferase II, (9) Fuktosyltransferase, (10) Galaktosyltransferase, (11) Sialyltransferase. Die Zeichen bedeuten: ■, N-Acetylglukosamin; ○, Mannose; ▲, Glukose; △, Fucose; ●, Galaktose; ◆, Sialinsäure. (Aus: Kornfeld und Kornfeld, 1985)

Für den Transport der neusynthetisierten Proteine zum Golgiapparat und dann zu ihren Bestimmungsorten schnüren sich Vesikel, die diese Proteine enthalten, von den Membranen eines Kompartimentes ab und fusionieren mit den Membranen des nächsten. Man stellt sich diesen Transport als Rezeptor-vermittelten Prozeß vor, dem ähnliche Mechanismen wie der gut untersuchten Rezeptor-vermittelten Endozytose zugrunde liegen (Roth und Porter, 1964; Goldstein et al., 1979; Pearse und Bretcher, 1981; Ungewickell und Branton, 1981). Dazu sind Erkennungsstellen auf dem zu transportierenden Protein, in der Membran verankerte Rezeptoren und eventuell Clathrin, das die Protein-Rezeptorkomplexe in "coated vesicles" sammelt, notwendig.

Am besten verstanden ist die Beteiligung von Kohlenhydratresten und spezifischen Rezeptoren beim Transport saurer Hydrolasen zu den Lysosomen. Auf diese Enzyme wird in den cis-Zisternen des Golgiapparates Mannose-6-Phosphat übertragen. Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren sondern die so markierten Enzyme von den übrigen den Golgiapparat durchquerenden Proteinen ab und vermitteln ihre Beförderung zu den Lysosomen via "coated vesicles". Tunicamycin- oder Deoxymyrjimycin-Behandlung von Fibroblasten führt, anstelle des Transportes in die Lysosomen, zur Sekretion dieser sauren Hydrolasen (Figura und Haslik, 1984). Der Transport lysosomaler Enzyme zu ihrem Bestimmungsort muß aber auch auf andere als in der eben beschriebenen Weise möglich sein, da in einer Reihe von Zelltypen, darunter Zellen von *D. discoideum*, in deren Lysosomen große Mengen saurer

Hydrolasen akkumulieren, kein Mannose-6-Phosphat-Rezeptor nachgewiesen werden konnte (Gabel et al., 1983; Mierendorf et al., 1985).

In der vorliegenden Arbeit sollte die posttranslationale Modifizierung der CSA untersucht werden. Ausgangspunkt dieser Studien war die Identifizierung einer CSA-Vorstufe durch Pulse/Chase-Experimente. Diese wurde mit dem vollständig glykosylierten Protein und den in Gegenwart von Tunicamycin oder in Mutanten synthetisierten partiell glykosylierten Produkten verglichen. Auf diese Weise konnten zwei Glykosylierungsschritte unterschieden werden, deren Reihenfolge durch Pulse/Chase-Experimente bestimmt wurde. Durch Untersuchung der Kohlenhydratsulfatierung in-vivo und in einem zellfreien System wurde in Kombination mit der Fraktionierung der zellulären Membranen der im Golgiapparat ablaufende Teil der Glykosylierung ermittelt. Es sollte weiterhin geklärt werden, wie der intrazelluläre Transport der CSA und ihre Stabilität in der Zelle von der Glykosylierung beeinflusst wird. Es zeigte sich, daß die Kohlenhydratketten essentiell für den Transport der CSA sind und daß sie deren proteolytische Degradation beeinflussen.

MATERIAL UND METHODEN

Zellkultur

Zellen des Stammes AX2-214 von *D.discoideum*, der in der vorliegenden Arbeit als Wildtyp bezeichnet wird, wurden in Schüttelkultur in axenischem Medium gezogen (Malchow et al., 1972). Zellen der Mutante HL220 (Murray et al., 1984) wuchsen in Schüttelkultur auf *E.coli* B/r. Die Anfangsdichte der Bakterien betrug 1×10^{10} Bakterien/ml (Gerisch et al., 1985a). Die Mutante HG220 ist ein durch genetische Rekombination gewonnener axenisch wachsender Stamm, der die für die unvollständige Glykosylierung der CSA-Polypeptidkette verantwortliche Mutation der ursprünglichen HL220-Mutante trägt (E. Wallraff, unveröffentlichte Ergebnisse). Sie stand erst im fortgeschrittenen Stadium der Arbeit zur Verfügung und wurde dann, da sie einfacher zu kultivieren war, statt der nicht axenischen Mutante HL220 benutzt. Die Mutanten HG592 (Gerisch et al., 1985b) und die daraus durch Mutagenese mit MNNG entstandenen Mutanten HG701 (M. Yoshida, unveröffentlichte Ergebnisse) und HG702 (M. Yoshida, unveröffentlichte Ergebnisse) wurden ebenfalls in Schüttelkultur in axenischem Medium gezogen. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten *D.discoideum*-Stämme befindet sich auf S.37. Zum Hungern wurde der Wildtyp AX2 und die Mutante HG220 bei einer Dichte von höchstens 5×10^6 Zellen/ml, die Mutanten HG592 und HG701 bei einer Dichte von höchstens 2×10^6 Zellen/ml durch Zentrifugation bei $1000 \times g$ für 3 Minuten geerntet. Die Mutante HG702, die auf die

gleiche Weise geerntet wurde, wuchs in Schüttelkultur nicht über 1×10^6 Zellen/ml hinaus. Die Mutante HL220 wurde geerntet, sobald die Dichte von E.coli B/r auf 1×10^9 Bakterien/ml gesunken war. Die Zellen wurden mit 17 mM Phosphatpuffer pH 6,0 gewaschen und im gleichen Puffer zu einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml resuspendiert (Malchow et al., 1972). Wenn nicht anders angegeben, begann die Tunicamycin-Behandlung der Zellen ($2 \mu\text{g/ml}$) 2 Stunden nach Induktion der Entwicklung durch Zugabe einer entsprechenden Menge Stammlösung (1 mg/ml Tunicamycin von Boehringer in 40% Äthanol/60% 0,1 N NaOH). Die Entwicklung der Tunicamycin-behandelten Zellen des Wildtyps sowie der Mutanten HL220 und HG220 wurde durch Pulse von 2×10^{-8} M cyclo AMP in 6 minütigem Abstand stimuliert (Ochiai et al., 1982b). Die Stimulierung der Mutanten mit cyclo AMP begann 1 Stunde nach Induktion der Entwicklung, die Stimulierung des Tunicamycin-behandelten Wildtyps sofort nach Zugabe des Inhibitors.

Isotopenmarkierung

Zur Markierung mit $[^{35}\text{S}]$ Sulfat und $[^3\text{H}]$ Prolin in der Vermehrungsphase kam zu 1 ml einer AX2-Zellsuspension bei einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml und zu 1 ml einer HG702-Zellsuspension bei einer Dichte von 3×10^5 Zellen/ml in Costa Platten $20 \mu\text{Ci}$ $[^{35}\text{S}]$ Sulfat oder $[^3\text{H}]$ Prolin. Nach 36 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert, dreimal in 1 ml Phosphatpuffer gewaschen und in $100 \mu\text{l}$ desselben Puffers resuspendiert. Zu $10 \mu\text{l}$ dieser Zellsuspension kamen $30 \mu\text{l}$ Aceton. Nach 20 Minuten bei -20°C wurde abzentrifugiert, das

Pellet mit 100 μ l Aceton/Wasser 3:1 (v/v) gewaschen, in 50 μ l Probenpuffer aufgenommen und im Scintillationszähler die inkorporierte Radioaktivität bestimmt. Die restlichen 90 μ l Zellsuspension wurden mit 3fach konzentriertem SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970) versetzt und gekocht.

Zur Langzeitmarkierung sich entwickelnder Zellen mit [35 S] Sulfat wurden 300 μ Ci/ml des Isotops zu Beginn der Entwicklung gegeben. Nach 6,5 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert und 3 mal im ursprünglichen Volumen Phosphatpuffer gewaschen.

Zur Pulse/Chase-Markierung wurden die Zellen des Wildtyps oder der Mutante HG220 nach 5 Stunden Entwicklungszeit mit [35 S] Sulfat oder [35 S] Methionin in 1,5 ml Eppendorfgefäßen auf dem Schnellschüttler inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (2000xg, 40 Sekunden) und mit frischem Phosphatpuffer, der unmarkiertes Methionin bzw. Sulfat enthielt auf das Ausgangsvolumen eingestellt. In dem in Fig.34 gezeigten Experiment wurden Zellen der Mutante HG220 in 1 mM unmarkiertes Sulfat enthaltendem Medium, in dem sich Mutantenzellen 5 Stunden entwickelt hatten, resuspendiert. Nach der entsprechenden Chase-Zeit wurde ein Aliquot der Zellsuspension in der Eppendorffzentrifuge kurz abzentrifugiert und die sedimentierten Zellen und die Überstände eingefroren.

Zur Markierung der auf Nitrocellulose (BA85, Schleicher & Schüll) abgeklatschten Zellkolonien (Fig.50) wurden die Filter auf Whatman 3 MM Chr-Papier, das mit 17 mM

Phosphatpuffer; 300 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{35}S] Sulfat durchfeuchtet war, gelegt. Nach 14 Stunden bei Raumtemperatur in einem geschlossenen Behälter wurden die Filter auf eine mit Trockeneis gekühlte Aluminiumplatte überführt. Nach 5 Minuten wurden die Filter von der Platte genommen und auf Raumtemperatur gebracht. Es wurde einmal mit 10 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,9% (w/v) NaCl; 0,05% (w/v) Tween 20, einmal mit 0,1 M Essigsäure und anschließend noch zweimal mit dem Tris-Puffer gewaschen.

Nachweis von PAPS in aggregationskompetenten Zellen

Wildtypzellen wurden nach 2 Stunden Entwicklungszeit 2,5 Stunden lang mit 300 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{35}S] Sulfat inkubiert. 100 μl Zellsuspension wurden abzentrifugiert (2000xg, 1 Minute), der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 100 μl Aceton/Wasser 90:10 (v/v), das 33 nMole unmarkiertes PAPS enthielt, resuspendiert. Nach 30 Minuten bei -20°C wurde bei 10 000xg in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert und das Pellet mit 40 μl kaltem Aceton/Wasser 75:25 (v/v) extrahiert. Es wurde wie oben zentrifugiert und das Volumen des Überstandes in einem Stickstoffstrom auf 10 μl reduziert. Die Probe wurde neben einem [^{35}S] PAPS-Standard auf eine 20x20 cm Cellulosedünnschichtplatte (F1440/LS254, Schleicher & Schüll) gegeben. Die Elektrophorese wurde für 50 Minuten bei pH 3,5 in H_2O :Essigsäure:Pyridin 94,5:50:0,5 (v/v/v) durchgeführt, wobei 500 V Spannung angelegt wurden. Nach der Elektrophorese wurde die Position von PAPS durch Autoradiographie und durch Fluoreszenzquench bestimmt. Von

der PAPS enthaltenden Stelle wurde die Cellulose gesammelt und mit destilliertem Wasser eluiert. Die Eluate wurden nach Konzentration durch Lyophilisation auf einer PEI-Cellulose-dünnschichtplatte (CEL300 PEI/UV 254, Machery-Nagel) in 0,75 M $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 3,5 chromatographiert und anschließend autoradiographiert. Dieses Protokoll (erst Fällung mit Aceton/Wasser 90:10 (v/v), dann Extraktion mit Aceton/Wasser 75:25 (v/v)), wurde gewählt, da ein Überstand der Fällung mit Aceton/Wasser 75:25 (v/v) nur verschmierte Signale ergab. In einem Kontrollversuch wurde 50% des zu unmarkierten Zellen unmittelbar vor der Lyse gegebenen [^{35}S] PAPS in dem so hergestellten Acetonextrakt wiedergefunden.

Präparation von Zellhomogenaten und von subzellulären Fraktionen

Nachfolgende Arbeitsschritte wurden bei 4°C ausgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen nach 6,5 Stunden Entwicklungszeit abzentrifugiert (1000xg, 3 Minuten), einmal mit kaltem 17 mM Phosphatpuffer pH 6,0 gewaschen und zu einer Dichte von $2,5 \times 10^8$ Zellen/ml in 10 mM Hepes-NaOH, pH 7,4, 1 mM DTT (DTT-Hepes Puffer) resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Parrbombe durch Stickstoffeinschluß nach Equilibrierung für 10 Minuten bei 1000 psi lysiert. Im Lysat konnten mikroskopisch keine intakten Zellen nachgewiesen werden. 10 ml bis 40 ml des Homogenates wurden für 20 Minuten bei 10 000xg in einem Sorvall SS-34

Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in DTT-Hepes Puffer resuspendiert (10 000xg Pelletfraktion). Der Überstand wurde für 1 Stunde bei 100 000xg in einem Beckmann 50 Ti Rotor zentrifugiert. Der Überstand (100 000xg Überstandsfraktion) wurde gesammelt und das Pellet in DTT-Hepes Puffer resuspendiert (100 000xg Pelletfraktion). Die Pelletfraktionen wurden auf das Volumen des Homogenates, dem sie entstammten, eingestellt. In den Experimenten, die in den Figuren 25, 44 und 57 gezeigt werden, wurden die 10 000xg Pelletfraktionen auf ein Viertel des Ausgangsvolumens eingestellt.

Zur Zentrifugation in einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten wurden 8 ml des Überstandes einer 10 000xg Zentrifugation (Fig.19 und Fig.24) oder 8 ml einer 10 000xg Pelletfraktion (Fig.27 und 28) auf einen Gradienten geschichtet, der von oben nach unten aus 6 ml Schichten von je 1,45 M, 1,32 M, 1,17 M, 1,02 M, 0,88 M Saccharose in DTT-Hepes Puffer bestand. Nach 18 Stunden Zentrifugation bei 25 000 rpm in einem Beckmann SW 27 Rotor wurden nacheinander von oben nach unten 7 oder 8 Fraktionen durch Einstechen einer Kanüle in die 6 oder 7 entsprechenden Positionen des Zentrifugenröhrchens in Einwegspritzen gesammelt. Die letzte Fraktion wurde durch Resuspendieren des Pellets in dem im Zentrifugenröhrchen verbliebenen Volumen erhalten.

Membranfraktionen wurden durch Einfrieren eines Zellpellets oder einer Zellsuspension von höchstens $2,5 \times 10^8$ Zellen/ml in DTT-Hepes Puffer und anschließender

Zentrifugation für 20 Minuten bei 10 000xg hergestellt.

Zellfreie Sulfatierung

Die Bedingungen für die Sulfatierung mit [^{35}S]PAPS waren ähnlich denen, die kürzlich beschrieben wurden (Lee und Huttner, 1983; Lee und Huttner, 1985). Das in der PAPS-Lösung vorhandene Äthanol wurde durch einen Stickstoffstrom abgeblasen. Zu 10 μl DTT-Hepes Puffer 25 mM MgCl_2 , 10 mM MnCl_2 , 50 μM ^{35}S PAPS (1-2 Ci/mmol, New England Nuclear) kamen 40 μl Zellhomogenat oder subzelluläre Fraktionen (Standard Sulfatierungsansatz). Nach 15 Minuten bei 22°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 μl 3-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970) und sofortiges Kochen für 3 Minuten beendet.

Für die 2D-PAGE, die in Fig. 25 gezeigt ist, wurde ein 160 μl Aliquot der 100 000xg Pelletfraktion des Wildtyps und ein 240 μl Aliquot der gleichen Fraktion der Mutante HL220 in einem Endvolumen von 200 μl bzw. 300 μl mit [^{35}S]PAPS inkubiert. Nach der Reaktion wurden die Proben auf 0°C abgekühlt, mit 0,75 Volumen DTT-Hepes Puffer, der 2,3% (v/v) Octyloligooxyäthylen (Rosenbusch et al, 1982) enthielt, gemischt und 30 Minuten auf Eis gehalten. Es wurde in der Airfuge (Beckmann) bei 4°C für 30 Minuten bei 30 psi zentrifugiert. Aus den Überständen wurden die Proteine durch Zugabe von 3 Volumen Aceton präzipitiert, getrocknet und im Lysispuffer (O'Farrell, 1975) aufgelöst.

Bestimmung der PAPS-Hydrolyse im Standard Sulfatierungsansatz

Zu bestimmten Zeiten wurden dem Standard Sulfatierungsansatz Proben entnommen und daraus - wie im Abschnitt "PAPS-Nachweis" beschrieben - ein Acetonextrakt bereitet. Ein Teil dieses Extraktes wurde auf einer PEI-Cellulosedünnschichtplatte chromatographiert (siehe oben) und autoradiographiert. Mit Hilfe des Autoradiogramms wurden Radioaktivität enthaltende Bereiche der Dünnschichtplatte identifiziert, daraus die Cellulose gesammelt und im Scintillationszähler die darin enthaltene Radioaktivität quantifiziert.

Gelelektrophorese, Autoradiographie und Fluorographie

Die Proben wurden durch SDS-PAGE (Laemmli, 1970) in 10% (w/v) Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Gele waren 1,5 mm dick und auf einer Breite von 15 cm befanden sich 15 Spuren. Die Elektrophorese, die bei 300 V durchgeführt wurde, wurde beendet sobald die Bromphenolblaufront 10 cm durch das Trenngel gewandert war. Zur Kalibrierung der Gele wurde ein Gemisch von Proteinen definierten Molekulargewichtes verwendet (high molecular weight standard, Bio-Rad). Diese Proteine wurden mit [^{14}C] Formaldehyd radioaktiv markiert (Dottavio-Martin und Ravel, 1978). Die 2D-PAGE wurde nach O'Farrell (1975) in der ersten Dimension in 11 cm langen Rundgelen in Gegenwart von 1% (v/v) Ampholyte pH 3-10 (Pharmacia) und 4% (v/v) Ampholyte pH 4-6 (LKB) für 18 Stunden bei 400 V durchgeführt. Zur Bestimmung des

pH-Gradienten wurde ein Kontrollgel in 1 cm lange Stückchen geschnitten, diese mit 0,5 ml destilliertem Wasser extrahiert und der pH-Wert gemessen. In der zweiten Dimension wurden 10% (w/v) Polyacrylamidgele verwendet und die Elektrophorese wie oben beschrieben durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine bei 48 V in 30 mM Tris/Glycin; pH 8,3; 20% (v/v) Methanol innerhalb von 90 Minuten auf Nitrocellulose (BA85, Schleicher & Schüll) transferiert (Vaessen et al., 1981). Die Filter wurden getrocknet und bei Raumtemperatur autoradiographiert. Zur Fluorographie wurden die Filter in 20% (w/v) PPO in Toluol getaucht, getrocknet und bei -70°C exponiert. Zur Autoradiographie und Fluorographie wurden Kodak XAR-5 Filme benutzt. Wurden die Filter nach der Fluorographie immunmarkiert, wurde PPO durch Waschen mit Toluol entfernt.

Immunmarkierung der Nitrocellulosefilter

Zur Detektion des CSA-Glykoproteins und seiner unterglykosylierten Formen wurden die Protein-spezifischen anti-CSA mAk's 33-294-17 und 20-6-4 benutzt (siehe S.37 Tab.1; Bertholdt et al., 1985; Ochiai et al., 1982b). Zur Detektion der Typ2 Kohlenhydratkette wurde mAk 12-120-94 benutzt (siehe S.37 Tab.1; Bertholdt et al., 1985; Ochiai et al., 1982b). Zur Detektion des entwicklungsregulierten 56 kDa Membranproteins wurde mAk 83-418-1 verwendet. Die Filter wurden 30 Minuten lang in 10 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,9% (w/v) NaCl; 0,05% (w/v) Tween 20 abgesättigt. Darauf wurden sie für mindestens 2 Stunden mit dem mAk im gleichen Puffer wie

oben mit zusätzlich 2% (w/v) NaN_3 und 8% (w/v) Rinderserumalbumin inkubiert und nach Entfernen der mAk-Lösung in dem zur Absättigung des Filters benutzten Puffer 5 mal gewaschen. Die Markierung der Filter mit WGA und ConA erfolgte in der gleichen Weise, jedoch war in der ConA-Inkubationslösung kein Rinderserumalbumin vorhanden. Die mAk's und die Lektine waren nach der Chloramin T-Methode direkt mit $[^{125}\text{J}]$ Jod markiert (Bolton, 1979). Die Inkubationslösungen enthielten $0,5\text{--}5 \times 10^6$ cpm/ml. Die spezifische Radioaktivität der mAk's betrug etwa 1×10^6 cpm/ μg , die der Lektine etwa $0,2 \times 10^6$ / μg .

Zur Unterscheidung des $[^{125}\text{J}]$ Jodsignals vom $[^{35}\text{S}]$ Sulfat-signal wurden in den Figures 5, 6, 22, 45, 51, 52, 53 und 56 zwei Filme übereinander bei Raumtemperatur exponiert. Die $[^{35}\text{S}]$ Sulfatstrahlung wurde dabei vollständig vom ersten Film absorbiert, so daß der zweite Film nur $[^{125}\text{J}]$ Jodsignale aufwies.

Quantifizierung der $[^{35}\text{S}]$ Sulfat- und der ^{125}J -mAk Markierung der auf Nitrocellulose transferierten Proteine

Nach Fluoro- oder Autoradiographie wurden die interessierenden Banden aus den Nitrocellulosefiltern ausgeschnitten. Zur Bestimmung von $[^{35}\text{S}]$ Sulfat wurden die etwa $0,5 \text{ cm}^2$ großen Filterstücke mit 5 ml Scintillationscocktail versetzt. Es wurde 30 Minuten geschüttelt und anschließend in einem Scintillationszähler die Radioaktivität quantifiziert. $[^{125}\text{J}]$ Jod wurde in einem γ -Zähler bestimmt. Abweichungen, verursacht durch unspezifisch an die

Nitrocellulose gebundenen $^{125}\text{J-mAk}$, wurden durch Subtraktion eines Background-Wertes berücksichtigt. Dieser wurde aus einem über der zu quantifizierenden $^{125}\text{J-Bande}$ gelegenen gleich großen Nitrocellulosestück ermittelt.

Es wurde eine Eichkurve erstellt, die nach oben bis zu einer CSA-Menge reichte, die in einer Membranfraktion von 5×10^6 Wildtypzellen nach 6,5 Stunden Entwicklungszeit enthalten ist. 1/16 dieser Menge ergab noch ein proportional vermindertes $^{125}\text{J-Signal}$. Kleinere Mengen wurden unterproportional wiedergegeben und deshalb die Meßdaten gemäß der Eichkurve korrigiert.

Immunpräzipitation der CSA

Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 0°C bis 4°C ausgeführt. Zellhomogenate oder Membranfraktionen, die 5×10^7 bis $2,5 \times 10^8$ Zellequivalente/ml enthielten wurden mit DTT-Hepes Puffer, der 1% (v/v) Octyloligoxyäthylen (Rosenbusch et al., 1982) enthielt, 30 Minuten inkubiert und ungelöstes Material abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit NaCl ad 150 mM und mit dem entsprechenden mAk ad 0,1 mg/ml versetzt und 2 Stunden inkubiert. Dazu kamen $50\mu\text{l}$ einer Suspension von Protein A-Sepharosebeads (1 Volumen gequollene Beads von Pharmacia + 4 Volumen DTT-Hepes Puffer 150 mM NaCl) pro $5\mu\text{g}$ IgG. Nach 30 Minuten auf dem Schnellschüttler, der das Sedimentieren verhinderte, wurden die Beads durch schwache Zentrifugation ($500 \times g$, 15 Sekunden) pelletiert und mit einem 100-fachen Volumen PBS pH 7,2 gewaschen. Die Waschflüssigkeit wurde mit einer fein

ausgezogenen Pasteurpipette vollständig entfernt und die Beads in 50 μ l SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970) 3 Minuten gekocht. Für die differentielle Immunpräzipitation (Fig.6) wurde nach der Fällung mit mAk 40-178-3 der Überstand mit mAk 41-71-21 inkubiert und wie oben aufgearbeitet.

Das Immunpräzipitat mit mAk 41-71-21 enthielt 70% der CSA-Menge, die in einem entsprechenden Detergenzextrakt gefunden wurde. Der Antikörper wurde vollständig von Protein A gefällt. Eine Erhöhung des Antikörper/CSA-Verhältnisses brachte keine höhere Ausbeute. Der zur Identifikation der CSA im Immunoblot verwendete mAk 33-294-17 war nicht in der Lage native CSA zu präzipitieren.

Zur Zelloberflächenmarkierung wurden intakte Zellen bei einer Dichte von $1,0 \times 10^8$ bis $2,5 \times 10^8$ Zellen/ml in DTT-Hepes Puffer mit mAk 41-71-21 (0,1 mg/ml) auf dem Schnellschüttler 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde ein 10-faches Volumen DTT-Hepes Puffer zugefügt, die Zellen wurden abzentrifugiert (1 Minute, 2000xg), mit DTT-Hepes Puffer (10-faches Inkubationsvolumen) gewaschen und mit DTT-Hepes Puffer-1% Octyloligooxyäthylen (Rosenbusch et al., 1982) zum ursprünglichen Volumen resuspendiert. Nach 10 Minuten, während denen die Zellen lysiert und Membran-ständige Proteine solubilisiert wurden, wurde ungelöstes Material abzentrifugiert und der Überstand wie oben beschrieben aufgearbeitet. Abweichend wurde die Inkubationszeit mit Protein A-Sepharose von 30 Minuten auf 15 Minuten reduziert.

In dem in Fig.34 gezeigten Experiment wurden die

eingefrorenen Zellpellets mit Phosphatpuffer auf 1×10^7 Zellequivalente/ml eingestellt. Diese Zellhomogenate und die Medien wurden mit EDTA ad 5 mM, PMSF ad 1 mM, Benzamidin ad 10 mM, Octyloligooxyäthylen ad 1% (v/v), NaCl ad 150 mM und mAk 41-71-21 ad $5 \mu\text{g/ml}$ versetzt. Nach 20 Minuten wurden 50 μl der Protein A-Sepharosebeads-Suspension pro 5 μg IgG zugefügt und 10 Minuten auf dem Schnellschüttler inkubiert. Anschließend wurde wie oben aufgearbeitet.

Endoglykosidase-Abbau

Die Reaktionsansätze in den Experimenten, die in Fig.8, Fig.9 und Fig.56 C gezeigt sind, enthielten entweder Homogenate ($2,5 \times 10^8$ Zellequivalente/ml), die mit einem dreifachen Volumen DTT-Hepes-Puffer-0,7% (v/v) Octyloligooxyäthylen verdünnt waren oder Detergenzextrakte der Fraktionen 4 und 8 des Saccharosegradienten (Fig.19). Diese Extrakte wurden hergestellt, indem 2 ml der Fraktionen 4 oder 8 mit 8 ml DTT-Hepes Puffer verdünnt und für 1 Stunde bei 100 000xg zentrifugiert wurden. Die Pellets wurden in 0,4 ml DTT-Hepes Puffer-0,5% (v/v) Octyloligooxyäthylen resuspendiert, nach 30 Minuten auf Eis wie oben zentrifugiert und die Überstände mit den Endoglykosidasen inkubiert. Für das Experiment, das in Fig.57;A und Fig.57;B gezeigt ist, wurde eine 100 000xg Pelletfraktion, die nur auf ein Viertel des Volumens des Homogenates resuspendiert worden war, im Standard-Ansatz zellfrei sulfatiert, auf 0°C abgekühlt und 30 Minuten in der Airfuge (Beckmann) bei 3000 psi zentrifugiert. Es wurde in DTT-Hepes Puffer-1%

Octyloligooxyäthylen zum Ausgangsvolumen resuspendiert, das Gemisch nach 30 Minuten auf Eis erneut in der Airfuge zentrifugiert und der Überstand mit Endoglykosidase F inkubiert.

40 μ l Proben der Homogenatverdünnungen oder der Extrakte der subzellulären Fraktionen wurden durch Zugabe von 5 μ l einer Lösung, die 200 mM NaH_2PO_4 , 30 mM EDTA, 10% (v/v) 2-Mercaptoäthanol und 1% (w/v) SDS enthielt, auf pH 6,1 eingestellt und 2 Minuten gekocht. Anschließend wurden 6 μ l einer Lösung von 5 mM PMSF, 100 mM Benzamidin und 1 μ l Endoglykosidase F (0,8 U, New England Nuclear) oder 5 μ l Endoglykosidase H (6,4 mU, freundlicher Weise von T. Kreis, EMBL Heidelberg, zur Verfügung gestellt) zugefügt. Nach 16 Stunden bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970) und Kochen gestoppt.

Aktivitätsbestimmung der Markerenzyme

Alle Reaktionen wurden bei 25°C durchgeführt. Der Substratumsatz war während der Reaktionszeit konstant.

Zur Bestimmung von cyclo AMP-Phosphodiesterase in Homogenaten und subzellulären Fraktionen kamen 50 μ l Proben, die 10-40 μ g Protein enthielten, zu einer Reaktionslösung aus 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 8 mM MgCl_2 ; 2,5 mM DTT; 20 mM [^3H]cylo AMP (80 mCi/mMol; Amersham) und 200 U/ml alkalische Phosphatase (Boehringer, Mannheim). Nach 10 Minuten Reaktionszeit wurden die Proben für 2 Minuten gekocht. Nicht umgesetztes [^3H]cylo AMP wurde entfernt durch Zugabe von

1,25 ml einer Dowex 1-X2 Suspension (1 Volumen Beads + 3 Volumen 3 mM Essigsäure), 5 Minuten Schütteln bei Raumtemperatur und anschließender kurzer Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge. Die Radioaktivität im Überstand, die im Scintillationszähler bestimmt wurde, stammte von Adenosin, zu dem das durch Phosphodiesterase gebildete AMP durch die alkalische Phosphatase weiter umgesetzt worden war.

Die 5'-Nucleotidase wurde wie beschrieben bestimmt (Gentry und Olsson, 1975), wozu $100 \mu\text{M}$ [^{14}C] 5'-AMP (80 mCi/mol, Amersham) und Proben von Homogenat und subzellulären Fraktionen benutzt wurden, die 0,4-1,6 mg Protein enthielten.

Alkalische Phosphatase wurde wie beschrieben (Solyom und Trams, 1972) bestimmt, wozu 5 mM p-Nitrophenylphosphat als Substrat benutzt wurde. Die Proben des Homogenates und der subzellulären Fraktionen der differentiellen Zentrifugation enthielten 0,4-1,6 mg Protein, die Proben der Saccharosegradientenfraktionen enthielten 20-100 μg Protein.

Succinatdehydrogenase (de Duve et al., 1955), α -Mannosidase (Loomis, 1970) und NADPH Cytochrom c-Reduktase (Duppel et al., 1973) wurden wie in den genannten Arbeiten bestimmt. Die Proben von Homogenat und subzellulären Fraktionen enthielten 0,02-0,4 mg Protein.

Trägerfreie Elektrophorese

Zellen in der Wachstumsphase oder aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien wurden zentrifugiert, in einem Puffer, der 10 mmol Äthanolamin, 10 mmol Essigsäure, 10 mmol EDTA und 150 mmol NaCl pro Liter enthielt und mit NaOH ad pH 7,4 eingestellt war, zu einer Dichte von 1×10^7 resuspendiert und 15 Minuten auf Eis gehalten. Zur Dissoziation von Aggregaten wurden die Zellsuspensionen mehrmals durch eine $50 \mu\text{m}$ -Nylon-gaze passiert. Die trägerfreie Elektrophorese erfolgte in einer von K. Hannig entwickelten Apparatur (Hannig, 1982) bei 9°C und einer Feldstärke von 90 V/cm. Es wurde der oben beschriebene Puffer ohne NaCl und EDTA als Trennpuffer verwendet. Die Verweilzeit der Zellen im elektrischen Feld betrug etwa 50 Sekunden.

Mutagenese und Selektion von Sulfatierungs-gestörten Mutanten

AX2-Zellen (1×10^7 Zellen/ml) wurden durch Inkubation mit 1 mg/ml MNNG im Dunkeln für 20 Minuten bei Raumtemperatur in 17 mM Phosphatpuffer mutagenisiert. Die Überlebensrate betrug 1%. Die Zellen wurden gewaschen, auf 5 Erlenmeyerkolben verteilt und in Nährmedium (Malchow et al., 1972) in Anwesenheit von Penicillin und Streptomycin (100 Units/ml, Difco) kultiviert. Nach 4 Tagen wurden die Zellen in Nährstoff-freies Medium überführt, nach 6 Stunden geerntet und wie oben beschrieben durch trägerfreie Elektrophorese getrennt, wobei 35 Fraktionen aufgefangen wurden. Nach der Trennung wurden die Fraktionen wie in Fig.49 angegeben

vereinigt, der Trennpuffer in einer Nalgene-Filtrierapparatur abgesaugt und die Zellen in einer E. coli B/r Suspension (1×10^{10} Bakterien/ml) aufgenommen.

Andere Methoden

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951), wozu Rinderserumalbumin zur Standardisierung benutzt wurde. Die Tyrosinsulfatbestimmung wurde wie beschrieben durchgeführt (Huttner, 1984; Lee und Huttner, 1983).

<u>mAk</u>	<u>gerichtet gegen</u>	<u>verwendet für</u>
33-294-17	denaturierte CSA-Polypeptidkette	Immunoblotting
20- 6- 4	denaturierte CSA-Polypeptidkette	Immunoblotting
12-120-94	Typ2 Kohlenhydrat	Immunoblotting
41- 71-21	native CSA-Polypeptidkette	Immunpräzipitation
40-178- 3	Typ2 Kohlenhydrat	Immunpräzipitation
83-418- 1	56 kDa Membranprotein	Immunoblotting

Tab.1 Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper

<u>Stamm</u>	<u>Wachstum</u>	<u>Phänotyp</u>	<u>exprimierte CSA-Form</u>
AX2	axenisch	Wildtyp	80 kDa
HL220	nicht axenisch	kein Typ2 Kohlenhydrat	68 kDa
HG220	axenisch	kein Typ2 Kohlenhydrat	68 kDa
HG592	axenisch	Expression der CSA in der veg. Phase	80 kDa
HG701	axenisch	Expression der CSA in der veg. Phase + kein Typ2 Kohlenhydrat	68 kDa
HG702	axenisch	Expression der CSA in der veg. Phase + in vivo Sulfatinkorp. gestört	80 kDa (isoelektr. homogen)

Tab.2 Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten D.discoideum-Stämme

ERGEBNISSE

DIE GLYKOSYLIERUNG DER CSA-POLYPEPTIDKETTE

Identifizierung einer Vorstufe des CSA-Glykoproteins

Der monoklonale Antikörper 33-294-17 (siehe S.37 Tab.1) markiert in einem durch SDS-PAGE aufgetrennten Homogenat aggregationskompetenter Zellen von *D.discoideum* intensiv die Bande des CSA-Glykoproteins bei 80 kDa und daneben schwach eine zweite Bande bei 68 kDa (Fig.4). Dies sind die einzigen Proteine in einem Gesamthomogenat der Zellen mit denen dieser Antikörper reagiert. MAK 33-294-17 ist gegen ein Epitop auf der CSA-Polypeptidkette gerichtet, denn das Translationsprodukt des in *E.coli* klonierten CSA-Gens wird von diesem Antikörper erkannt (Noegel et al., 1986).

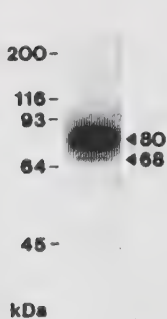


Fig.4 Markierung eines 68 kDa Proteins durch den monoklonalen Protein-spezifischen anti-CSA Antikörper 33-294-17

Die Proteine aus einem 3×10^6 aggregationskompetenten Wildtypzellen entsprechenden Homogenat wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosefilter transferiert, mit ^{125}I -MAK 33-294-17 markiert und autoradiographiert. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen des 80 kDa Glykoproteins und des 68 kDa Proteins sind rechts angegeben.

Das CSA-Glykoprotein und das Protein bei 68 kDa besitzen also mindestens eine gemeinsame antigene Determinante, die auf der Polypeptidkette lokalisiert ist. Letzteres könnte eine niedermolekulare Form des CSA-Glykoproteins sein, die entweder durch proteolytische Degradation entstanden ist, oder die eine Vorstufe in der Biosynthese des CSA-Glykoproteins darstellt.

Durch eine Pulse/Chase-Markierung von aggregationskompetenten Wildtypzellen mit [^{35}S]Methionin und anschließende Immunpräzipitation der CSA mit dem Protein-spezifischen mAk 41-71-21 (siehe S.37 Tab.1) konnte das 68 kDa Protein als CSA-Vorstufe im Immunoblot identifiziert werden. Für die Immunpräzipitation und die Markierung im Immunoblot mußten verschiedene Protein-spezifische anti-CSA mAk's verwendet werden, da mAk 33-294-17 die CSA nicht immunpräzipitiert aber nach Elektrophorese in Gegenwart von SDS gut markiert, mAk 41-71-21 umgekehrt die CSA zwar gut präzipitiert aber im Immunoblot nur schwach detektiert.

Die Radioaktivität, die während des [^{35}S]Methionin-Pulses in das 68 kDa Protein eingebaut worden war (Fig.5A;1), wurde während des Chases in das 80 kDa Glykoprotein übergeführt (Fig.5A;2,3,4). Die Markierung der Proteine mit ^{125}J -mAk 33-294-17 zeigt, daß das 68 kDa Protein nach dem Pulse und während des Chases in den Zellen vorhanden war (Fig.5B;1-4). Die Lebensdauer der 68 kDa Vorstufe ließ sich aufgrund der Verschiebung der Methioninmarkierung von 68 kDa nach 80 kDa abschätzen. Schon nach 5 Minuten Pulsezeit war ein kleiner

Teil der inkorporierten Radioaktivität in das 80 kDa Glykoprotein übergeführt worden. Die vollständige Umwandlung des während des 5 Minuten langen Pulses synthetisierten 68 kDa Precursors in die reife 80 kDa Form benötigte etwas über 10 Minuten.

Zusammen mit den 80 kDa und 68 kDa Proteinen erschienen zwei weitere [³⁵S]Methionin-markierte Banden (Fig.5A). Das Protein bei 42 kDa dürfte Aktin sein, das als das mengenmäßig vorherrschende Protein der Zelle als Kontamination mitgefällt wurde. Die Präzipitation des Proteins bei 26 kDa konnte durch 0,3 M Galaktose verhindert werden, während die Fällung der CSA nicht beeinträchtigt wurde (Fig.5;4). Dieser Befund zeigt, daß das 26 kDa Protein Discoidin I ist. Discoidin I ist ein Lektin aus *D.discoideum*, das an Galaktose und somit auch an die zur Immunpräzipitation verwendeten Protein A-beschichteten Sepharosebeads bindet. Es besteht aus 4 Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 26 kDa (Frazier et al., 1975). Wurde die Immunpräzipitation in Anwesenheit von Galaktose durchgeführt, besetzte der Zucker die Bindestellen des Lektins und verhinderte so die Fällung durch die Sepharosebeads.

Das Pulse/Chase-Experiment mit [³⁵S]Methionin zeigt, daß das von den Protein-spezifischen monoklonalen anti-CSA Antikörpern 33-294-17 und 41-71-21 erkannte 68 kDa Protein kDa eine CSA-Vorstufe ist. Die beiden anderen im Immunpräzipitat auftretenden Proteine kommen als Vorstufen nicht in Betracht.

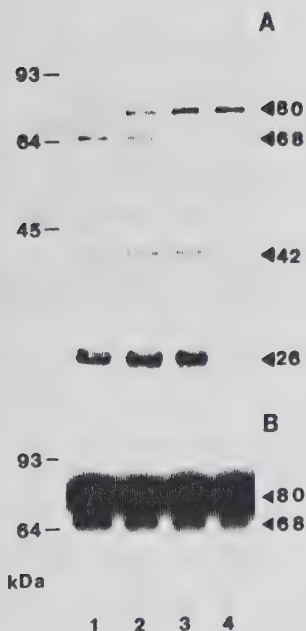


Fig.5 $[^{35}\text{S}]$ Methionin-Pulse/Chase Markierung in Wildtypzellen und anschließende Immunpräzipitation der CSA

Wildtypzellen wurden 5 Stunden nach Induktion der Entwicklung für 5 Minuten mit $0,3 \text{ mCi/ml}$ $[^{35}\text{S}]$ Methionin markiert. Die Zellen wurden zentrifugiert und in Phosphatpuffer, der $0,5 \text{ mM}$ unmarkiertes Methionin enthält, zum Ausgangsvolumen (1×10^7 Zellen/ml) resuspendiert. $0,2 \text{ ml}$ Proben mit 2×10^6 Zellen wurden unmittelbar nach dem Pulse (1), nach 5 Minuten (2) und nach 10 Minuten (3,4) entnommen und die CSA in Abwesenheit (1-3) oder in Anwesenheit von $0,3 \text{ M}$ Galaktose (4) immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und fluorographiert (A). Anschließend wurde mit ^{125}J -mAk 33-294-17 markiert und autoradiographiert (B). Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen des 80 kDa Glykoproteins, des 68 kDa Glykoproteins, sowie die des Aktins (42) und Discoidins (26) sind rechts angegeben.

Durch unterschiedliche Glykosylierung entstehen vier verschiedene CSA-Formen

Wenn sich *D.discoideum* Zellen in Gegenwart des N-Glykosylierungsinhibitors Tunicamycin entwickeln, werden CSA-Formen mit apparenten Molekulargewichten von 66 kDa und 53 kDa gefunden (Ochiai et al., 1982b). Die 80 kDa und 66 kDa Formen unterscheiden sich von der 53 kDa Form durch das Vorhandensein eines bestimmten Kohlenhydratrestes, der von Weizenkeim-Agglutinin (WGA) (Yoshida et al., 1984) und mAk 40-178-3 (Tab.1, Bertholdt et al., 1985) erkannt wird. WGA reagiert bevorzugt mit Chitobiose-Resten, der Antikörper mit einem N-Acetylglukosamin enthaltenden Epitop, denn er wird selektiv durch diesen Aminosucker blockiert (Bozzaro und Merkl, 1985). Das 53 kDa Protein dürfte die unglykosylierte Polypeptidkette darstellen, da das apparente Molekulargewicht dem aus der Aminosäuresequenz errechneten Molekulargewicht der CSA von 51,5 kDa nahezu gleicht. Diese Vermutung wird in der vorliegenden Arbeit gestützt werden.

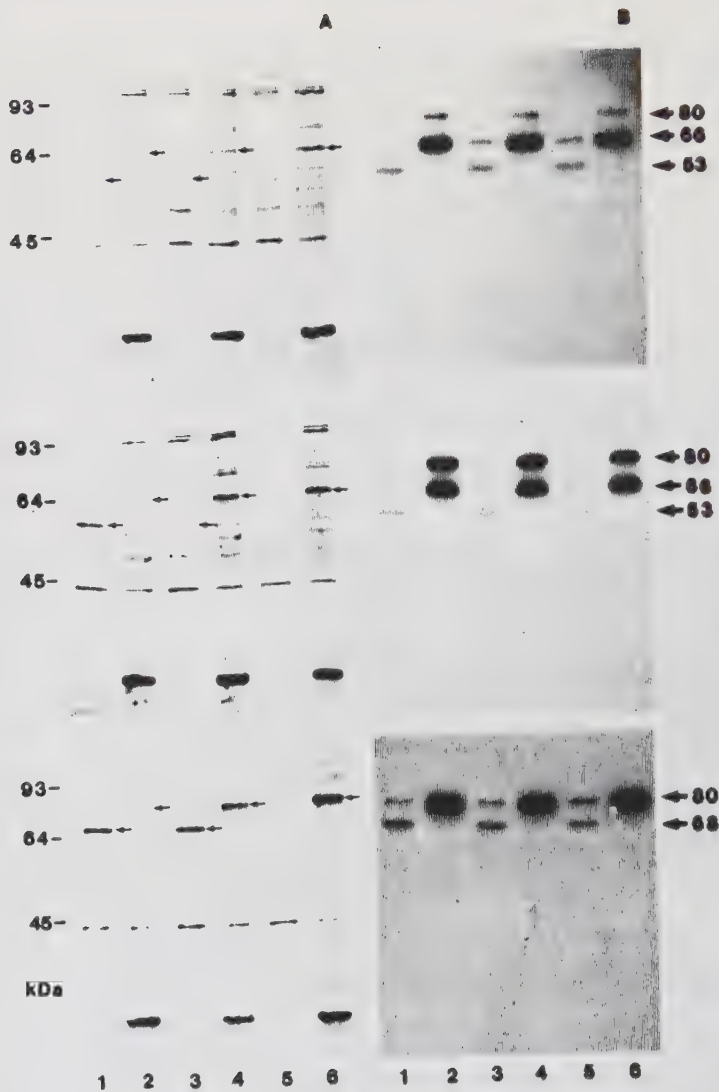
Es stellte sich die Frage, ob in Tunicamycin-behandelten Zellen das 66 kDa Glykoprotein aus der 53 kDa CSA-Form entsteht, ähnlich wie in unbehandelten Zellen die 80 kDa CSA-Form aus der 68 kDa Vorstufe hervorgeht. Um dies zu untersuchen, wurden Pulse/Chase Versuche mit [³⁵S]Methionin in Tunicamycin-behandelten Zellen durchgeführt. Die anschließende Immunpräzipitation der CSA wurde in der Weise vorgenommen, daß zunächst mit dem Kohlenhydrat-spezifischen mAk 40-178-3 (Fig.6;2,4,6) und anschließend mit dem

Protein-spezifischen mAk 41-71-21 (Fig.6;1,3,5) gefällt wurde.

Wurde den Zellen 2 Stunden nach Induktion der Entwicklung, d.h. vor dem Einsetzen der CSA-Synthese, Tunicamycin ad 0,4 µg/ml zugefügt, so wurde hauptsächlich das 66 kDa Glykoprotein gebildet (Fig.6B oben). Dieses wurde zusammen mit dem nur in Spuren vorhandenen 80 kDa Glykoprotein im ersten Fällungsschritt durch den Kohlenhydrat-spezifischen mAk aus dem Detergenzextrakt isoliert (Fig.6B oben;2,4,6), während das ebenfalls nur in sehr geringer Menge vorhandene 53 kDa Protein erst mit dem Protein-spezifischen mAk gefällt wurde (Fig.6B oben;1,3,5).

Fig.6 [³⁵S]Methionin-Pulse/Chase-Markierung in Tunicamycin-behandelten und unbehandelten Wildtypzellen und anschließende differentielle Immunpräzipitation

Wildtypzellen wurden in Anwesenheit von 0,4 g/ml (oben), 0,08 g/ml Tunicamycin (Mitte) und ohne Tunicamycin (unten) im Nährstoff-freien Puffer zur Entwicklung gebracht. Nach 5 Stunden wurden die unbehandelten Zellen für 5 Minuten, die Tunicamycin-behandelten Zellen für 15 Minuten mit 0,6 mCi/ml [³⁵S]Methionin Pulse-markiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in Phosphatpuffer, der 1 mM unmarkiertes Methionin enthält, resuspendiert. 0,5 ml Proben mit 5x10⁶ Tunicamycin-behandelten Zellen wurden unmittelbar nach dem Pulse (1,2), nach 15 Minuten (3,4) und nach 30 Minuten (5,6) entnommen. Von den unbehandelten Zellen wurden Proben mit 5x10⁶ Zellen unmittelbar nach dem Pulse (1,2), nach 5 Minuten (3,4) und nach 15 Minuten (5,6) genommen. Zunächst wurde mit dem Kohlenhydrat-spezifischen mAk 40-171-3 und anschließend aus dem gleichen Zellextrakt mit dem Protein-spezifischen mAk 41-71-21 präzipitiert. Die Immunpräzipitate des ersten (2,4,6) und des zweiten Fällungsschrittes (1,3,5) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und fluorographiert (A). Anschließend wurde mit ¹²⁵I-mAk 33-294-17 markiert und autoradiographiert (B). Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen der 80 kDa, 68 kDa, 66 kDa Glykoproteine und des 53 kDa Proteins sind rechts angegeben. Die [³⁵S]Methionin-markierten CSA-Formen sind durch Pfeile gekennzeichnet.



Nach einem 15 Minuten langen [^{35}S]Methionin-Pulse war die radioaktive Markierung der CSA zum größten Teil im 53 kDa Protein lokalisiert (Fig.6A oben;1,2). Während des Chases verschwand die radioaktive Markierung aus der 53 kDa Position (Fig.6A oben;3,5) und wurde mit dem Kohlenhydrat-spezifischen mAk in Form des 66 kDa Glykoproteins präzipitierbar (Fig.6A oben;4,6).

Das Discoidin wurde in den jeweils ersten Präzipitations-schritten aus dem Detergenzextrakt entfernt (Fig.6 oben;2,4,6). In diesem Experiment erschienen neben den Discoidin- und CSA- noch mehrere andere markierte Banden im Präzipitat. Dies war nicht nur im ersten Fällungsschritt, in dem der größte Teil der CSA erfaßt wurde, sondern auch im zweiten Fällungsschritt der Fall. Es handelt sich also bei diesen Banden um unspezifische Kontaminationen und nicht um Proteine, die spezifisch an das CSA-Glykoprotein oder den Antikörper gebunden und deshalb copräzipitiert wurden.

Wurde die Tunicamycinkonzentration auf $0,08 \mu\text{g/ml}$ reduziert, so akkumulierten die 80 kDa und 66 kDa Glykoproteine in etwa gleichem Ausmaß (Fig.6B Mitte). Wie im eben dargelegten Experiment, bei dem eine 5-fach höhere Tunicamycinkonzentration verwendet worden war, befand sich die [^{35}S]Methioninmarkierung der CSA nach dem Pulse zum größten Teil im 53 kDa Produkt (Fig.6A Mitte;1,2) und wurde während des Chases in das 66 kDa Glykoprotein übergeführt (Fig.6A Mitte;3-6). Eine Markierung des 80 kDa Glykoproteins und seiner 68 kDa Vorstufe fand nicht statt. Offensichtlich

war zum Zeitpunkt des [^{35}S]Methionin-Pulses die Synthese der 80 kDa Form bereits abgeschlossen, so daß nur das 66 kDa Glykoprotein gebildet wurde.

Die Zellen, die sich in Anwesenheit von 0,08 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin entwickelten, mußten dreimal länger als unbehandelte Zellen Pulse-markiert werden, um einen vergleichbaren Einbau von [^{35}S]Methionin zu erzielen. Noch niedriger war die inkorporierte Radioaktivität in Zellen, die mit 0,4 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin behandelt worden waren. Dies deutet darauf hin, daß neben der Glykosylierung auch die Proteinsynthese durch Tunicamycin beeinträchtigt wird, was auch von anderen Zellen bekannt ist.

Die Umwandlung der 53 kDa CSA-Vorstufe aus Tunicamycin-behandelten Zellen in das 66 kDa Endprodukt dauerte etwas länger als die Umwandlung der 68 kDa Vorstufe aus unbehandelten Zellen in das 80 kDa Endprodukt. Während die Pulse-markierte 68 kDa Vorstufe nach 10-minütigem Chase fast vollständig in die 80 kDa Form übergeführt worden war, war nach 15-minütigem Chase die Pulse-markierte 53 kDa Vorstufe noch deutlich vorhanden.

Der Befund, daß in Tunicamycin-behandelten Zellen anstelle der 68 kDa Vorstufe das 53 kDa Protein die zuerst detektierbare CSA-Form ist, deutet darauf hin, daß ein cotranslationaler Glykosylierungsschritt durch Tunicamycin inhibiert wird. Ein anderer, posttranslatiionaler Glykosylierungsschritt, der unter den gegebenen Bedingungen durch Tunicamycin nicht gehemmt wird, überträgt die

Kohlenhydratreste, die Bindestellen für WGA und mAk 40-178-3 enthalten, auf das 53 kDa Protein und überführt es in die 66 kDa CSA-Form.

Diese Überlegungen legen nahe, daß in unbehandelten Zellen die 68 kDa Vorstufe durch den gleichen posttranslationalen Glykosylierungsschritt in die 80 kDa CSA-Form übergeführt wird, durch den in Tunicamycin-behandelten Zellen die 66 kDa Form aus der 53 kDa Vorstufe entsteht. Um dies zu bestätigen wurde ein Pulse/Chase-Experiment mit [³⁵S]Methionin in unbehandelten Zellen durchgeführt. Anschließend wurden, wie in Tunicamycin-behandelten Zellen, die CSA zunächst mit dem Kohlenhydrat-spezifischen und dann mit dem Protein-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Das 80 kDa Glykoprotein wurde fast vollständig im ersten Fällungsschritt aus dem Detergenzextrakt abgetrennt (Fig.6B unten;2,4,6). Die 68 kDa CSA-Vorstufe präzipitierte erst im zweiten Fällungsschritt mit dem Protein-spezifischen Antikörper (Fig.6B unten;1,3,5). Wie in dem in Fig.5 beschriebenen Experiment wird das während des Pulses [³⁵S]Methionin-markierte 68 kDa Glykoprotein (Fig.6A unten;1,2) während des Chases in die 80 kDa CSA-Form übergeführt (Fig.6 unten;3-6). Der 68 kDa CSA-Vorstufe fehlt also wie der 53 kDa CSA-Vorstufe aus Tunicamycin-behandelten Zellen eine Kohlenhydratkomponente, die von mAk 40-178-3 erkannt wird.

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob der 68 kDa Vorstufe die Erkennungsstelle für WGA fehlt (Fig.7B).

Weiterhin wurde untersucht, ob dieser Vorstufe auch das Epitop für einen anderen Antikörper, mAk 12-120-94, fehlt (Fig.7A). Dieser Antikörper erkennt ähnlich wie mAk 40-178-3 die 80 kDa und 66 kDa, aber nicht die 53 kDa Form (Tab.1; Ochiai et al., 1982b). Die Bindung dieses Antikörpers kann durch N-Acetylglukosamin nicht inhibiert werden, woraus folgt, daß seine Spezifität nicht mit der des mAk 40-178-3 identisch ist.

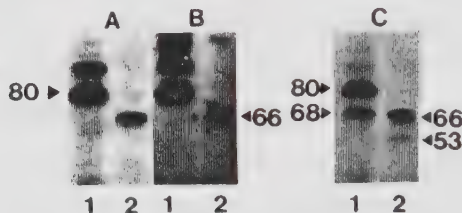


Fig.7 Der 68 kDa Vorstufe fehlen Epitope für den Kohlenhydrat-spezifischen anti-CSA mAk 12-120-94 (A) und Bindungsstellen für WGA (B)

Die Proteine einer subzellulären Fraktion, in der die 68 kDa CSA-Vorstufe angereichert ist (P100, siehe Fig.18) (1) und einer Membranfraktion von Tunicamycin-behandelten Wildtypzellen (2) wurden mit dem Kohlenhydrat-spezifischen anti-CSA ^{125}J -mAk 12-120-94 (A), mit ^{125}J -WGA (B) oder mit dem Protein-spezifischen anti-CSA ^{125}J -mAk 33-294-17 (C) markiert. Letzterer zeigt die Anwesenheit und die relative Menge der 80 kDa, 68 kDa, 66 kDa Glykoproteine und des 53 kDa Proteins. Zusätzlich zum 80 kDa und 66 kDa Glykoprotein wurde von ^{125}J -mAk 12-120-94 noch ein anderes Glykoprotein bei 106 kDa erkannt (Ochiai et al., 1982a). Von ^{125}J -WGA wurden neben diesem noch weitere Glykoproteine mit höherem Molekulargewicht markiert (Yoshida et al., 1984). Die in Spur 1 aufgetragenen Mengen entsprechen 1×10^7 Zellen, die in Spur 2 aufgetragenen Mengen entsprechen 3×10^5 Zellen. Die Positionen der markierten CSA-Formen sind angegeben.

Es wurde eine Membranfraktion unbehandelter Zellen, in der die 68 kDa CSA-Vorstufe angereichert ist, durch Immunoblotten untersucht. Das 80 kDa Glykoprotein, nicht aber seine 68 kDa Vorstufe, wurde von $^{125}\text{J-mAk 12-120-94}$ (Fig.7A;1) und von $^{125}\text{J-WGA}$ (Fig.7B;1) erkannt. Beide Proteine waren im Präparat vorhanden, wie die $^{125}\text{J-Markierung}$ mit dem Protein-spezifischen mAk 33-294-17 zeigt (Fig.7C;1). Eine der 68 kDa CSA-Vorstufe entsprechende Menge 66 kDa Produkt aus einer Membranfraktion Tunicamycin-behandelter Zellen (Fig.7C;2) wurde unter gleichen experimentellen Bedingungen von $^{125}\text{J-mAk 12-120-94}$ (Fig.7A;2) und von $^{125}\text{J-WGA}$ (Fig.7B;2) markiert.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die 68 kDa CSA-Vorstufe aus unbehandelten Zellen ebenso, wie die 53 kDa CSA-Vorstufe aus Tunicamycin-behandelten Zellen, weder von den beiden Antikörpern 40-178-3 und 12-120-94 noch von WGA erkannt wird. Die 68 kDa Vorstufe unterscheidet sich hierdurch von der 66 kDa Form Tunicamycin-behandelter Zellen und erweist sich als verwandt mit einer CSA-Form, die in einer Mutante von *D.discoideum* gefunden wurde. In dieser Mutante, die HL220 genannt wurde, konnten zunächst keine CSA während der Entwicklung nachgewiesen werden (Murray et al., 1984). Später wurde jedoch gezeigt, daß die Mutante anstelle des 80 kDa Glykoproteins eine 68 kDa CSA-Form synthetisiert (Gerisch et al., 1985a). Dieses Protein besitzt weder Erkennungsstellen für mAk 40-178-3 oder 12-120-94 (Bertholdt

et al., 1985) noch für WGA (Yoshida et al., 1984). Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wird noch näher auf das Verhältnis der 68 kDa CSA-Formen des Wildtyps und der Mutante eingegangen werden.

Tunicamycin blockiert die N-Glykosylierung der Proteine (Takatsuki et al., 1971a; Takatsuki und Tamura, 1971b). Die 53 kDa Vorstufe aus Tunicamycin-behandelten Zellen und die 68 kDa CSA-Vorstufe aus unbehandelten Zellen könnten sich daher durch N-glykosidisch gebundene Kohlenhydratketten voneinander unterscheiden. Durch Endoglykosidasebehandlung sollte in diesem Fall die 68 kDa Vorstufe zum 53 kDa Protein abgebaut werden. Um dies zu untersuchen, wurden Homogenate und Extrakte aus Membranfraktionen von Wildtypzellen, in denen die 68 kDa Vorstufe angereichert war (F4 und F8, siehe Fig.19), mit den Endoglykosidasen F (endo F) oder H (endo H) in Anwesenheit von SDS behandelt (Fig.8). Das 80 kDa Glykoprotein war resistent gegen beide Endoglykosidasen. Die 68 kDa Vorstufe wurde jedoch vollständig zu Formen niedrigeren Molekulargewichtes abgebaut. Das Produkt der Endoglykosidase F-Behandlung war ein 53 kDa Protein. Ein etwas höheres apparentes Molekulargewicht besaß das Hauptprodukt der Endoglykosidase F-Behandlung. Neben diesem wurde aber ebenfalls ein 53 kDa Protein und darüber hinaus ein drittes Abbauprodukt oberhalb des Hauptproduktes gefunden.

Auch das 68 kDa Produkt aus einer Membranfraktion der Mutante HL220 (HL220) wurde von Endoglykosidase F (endo F)

restlos degradiert (Fig.9;HL220). Im Gegensatz zur 68 kDa CSA-Vorstufe des Wildtyps entstanden jedoch neben der 53 kDa Form auch solche mit höherem Molekulargewicht.

Unter den für den Abbau der 68 kDa Formen des Wildtyps und der Mutante geeigneten Bedingungen wurde eine Membranfraktion von Tunicamycin-behandelten Zellen (AX2TM) mit Endoglykosidase F (endo F) in Gegenwart von SDS inkubiert (Fig.9;AX2TM). Das 66 kDa Glykoprotein, wie auch das 53 kDa Protein, zeigten keine Veränderung ihrer Mobilitäten in der SDS-PAGE.

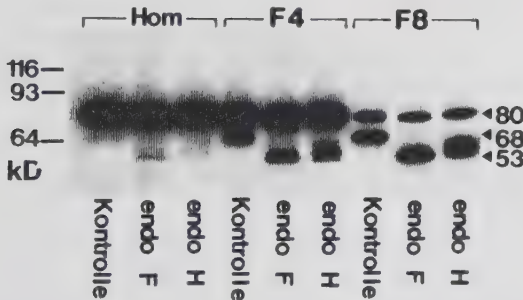
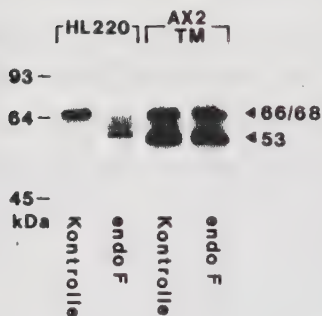


Fig.8 Sensitivität der 68 kDa CSA-Vorstufe und Resistenz des reifen 80 kDa Glykoproteins gegenüber den Endoglycosidasen F und H

Zellhomogenate (Hom) und Extrakte der Fraktionen 4 (F4) und 8 (F8) des diskontinuierlichen Saccharosegradienten der Fig.19 wurden ohne (Kontrolle) oder mit Endoglykosidase F (endo F) oder H (endo H) inkubiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert, mit mAk 33-294-17 markiert und autoradiographiert. Es wurden vom Homogenat 160 μ g Protein pro Spur aufgetragen. Die Fraktionen 4 und 8 wurden mit Octyloligoxyäthylen extrahiert und etwa 40 μ g der extrahierten Proteine pro Spur aufgetragen. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen des 80 kDa Glykoproteins, des 68 kDa Glykoproteins und des 53 kDa Proteins sind rechts angegeben.

Fig.9 Das 68 kDa Glykoprotein der Mutante HL220 ist sensitiv, die 66 kDa und 53 kDa Tunicamycinprodukte des Wildtyps sind resistent gegen Endoglykosidase F



Homogenate der Mutante HL220 (HL220) und vom Tunicamycin-behandelten Wildtyp AX2 (AX2TM) wurden ohne (Kontrolle) und mit Endoglykosidase F (endo F) inkubiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und fluorographiert (A). Anschließend wurde mit ^{125}J -mAk 33-294-17 markiert und autoradiographiert (B). Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen der 68 kDa und 66 kDa Glykoproteine und des 53 kDa Proteins sind rechts angegeben.

Die Ursache für die Resistenz der 80 kDa und 66 kDa CSA-Endprodukte aus unbehandelten bzw. Tunicamycin-behandelten Wildtypzellen gegenüber Endoglykosidaseabbau wird im Anhang zu dieser Arbeit (siehe S.154) weiter untersucht. Die beschriebenen Ergebnisse weisen die 68 kDa Vorstufe als Glykoprotein aus, dessen Kohlenhydratketten N-glykosidisch gebunden sind. Die Abspaltung dieser Kohlenhydratketten führt zum 53 kDa Protein. Das 68 kDa CSA-Produkt der Mutante ist durch seine Sensitivität gegen Endoglykosidase F ebenfalls als Glykoprotein ausgewiesen. Seine Kohlenhydrate sind jedoch schon zum Teil resistent, so daß auch teilglykosylierte Abbauprodukte entstehen.

Auf der Suche nach einem Nachweis für die auf der 68 kDa CSA-Vorstufe vorhandenen Kohlenhydrate wurde geprüft, ob Concanavalin A (ConA), von dem gezeigt wurde, daß es an das 80 kDa Glykoprotein bindet (Eitle und Gerisch, 1977), auch an die Vorstufe bindet. Im Gegensatz zu WGA, das neben dem CSA-Glykoprotein nur wenige membrangebundene Proteine aus aggregationskompetenten Zellen markiert und somit eine eindeutige Identifizierung dieses Proteins nach SDS-PAGE einer Membranfraktion erlaubt (siehe Fig.7; Yoshida et al., 1984), tragen sehr viele membrangebundene Proteine die ConA-Erkennungsstelle (Fig.10). Membranfraktionen von Zellen aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien zeigten Unterschiede des $^{125}\text{J-ConA}$ -Markierungsmusters. Dies betrifft die Zunahme der Intensität einer Bande bei 130 kDa, das Erscheinen neuer Banden bei 110 kDa und 150 kDa und das Verschwinden einer Bande bei 116 kDa. Im 80 kDa Bereich tauchte aber keine neue $^{125}\text{J-ConA}$ Bande während der Entwicklung auf. Offensichtlich war das entwicklungsregulierte CSA-Glykoprotein in zu geringer Menge vorhanden, um es neben überlagernden anderen ConA-bindenden Proteinen nachweisen zu können.

Um die Con-A-Bindung an das CSA-Glykoprotein und seine 68 kDa Vorstufe eindeutig nachweisen zu können, wurden diese Proteine vor der Markierung mit $^{125}\text{J-ConA}$ aus einer Membranfraktion von Wildtypzellen durch Immunpräzipitation mit dem Protein-spezifischen mAk 41-71-21 angereichert. Es konnte bestätigt werden, daß die 80 kDa CSA-Form an das Lektin bindet. Auch die 68 kDa Vorstufe wurde von ConA

erkannt (Fig.11A;2). Es ist auffallend, daß die $^{125}\text{J-ConA}$ Markierung der 80 kDa und 68 kDa Glykoproteine etwa gleich intensiv ist, obwohl von letzterem eindeutig weniger vorhanden ist, wie die Markierung eines identischen Blots mit $^{125}\text{J-mAk 33-294-17}$ zeigt (Fig.11B;2).

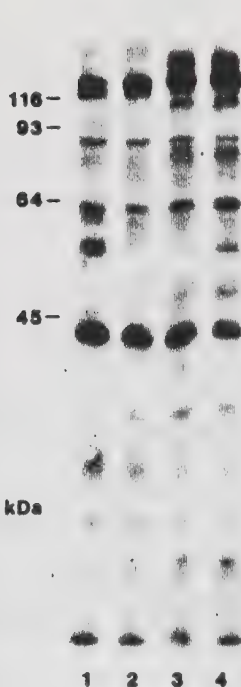


Fig.10 Durch $^{125}\text{J-ConA}$ markierte Glykoproteine im Homogenat von Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien

Zellen aus der Vermehrungsphase (1) und Zellen, die sich 2,5 Stunden (2), 5 Stunden (3) und 8 Stunden (4) entwickelt hatten, wurden in SDS-Probenpuffer gekocht. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert, mit $^{125}\text{J-ConA}$ markiert und autoradiographiert. Es wurden pro Spur Proteine von 1×10^6 Zellen aufgetragen. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links angegeben.

Um zu untersuchen, ob auch die Kohlenhydrate der 66 kDa CSA-Form an ConA binden, wurde aus einer Membranfraktion Tunicamycin-behandelter Wildtypzellen die 66 kDa CSA-Form immunpräzipitiert. Sie wurde ebensowenig von $^{125}\text{J-ConA}$ wie das 53 kDa Produkt markiert (Fig.11A;1). Die Markierung mit mAk 33-294-17 zeigt, daß vom 66 kDa Glykoprotein etwa so viel wie vom 80 kDa Glykoprotein und weit mehr als von der 68 kDa Vorstufe vorlag, deren ConA-Markierung eindeutig zu erkennen war (Fig.11B;1).

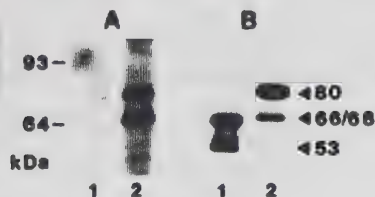


Fig.11 Die 68 kDa CSA-Vorstufe, aber nicht das in Gegenwart von Tunicamycin gebildete 66 kDa Produkt werden von ConA erkannt

Die 66 kDa und 53 kDa CSA-Formen aus Tunicamycin-behandelten Wildtypzellen und die 80 kDa und 68 kDa CSA-Formen aus unbehandelten Zellen wurden mit mAk 41-71-21 immunpräzipitiert. Immunpräzipitate aus 4×10^7 Tunicamycin-behandelten Zellen (1) oder $2,5 \times 10^7$ nicht behandelten Zellen (2) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert, mit $^{125}\text{J-ConA}$ (A) oder $^{125}\text{J-mAk 33-294-17}$ (B) markiert und autoradiographiert. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen des 80 kDa, des 68 kDa, des 66 kDa Glykoproteins und des 53 kDa Proteins sind rechts angegeben.

Der von Tunicamycin unterbundene N-Glykosylierungsschritt führt nach diesen Ergebnissen zur Übertragung von ConA-Erkennungsstellen auf die CSA-Polypeptidkette. Die Markierung mit ConA bietet eine weitere Möglichkeit, die Kohlenhydrate der 66 kDa und 68 kDa CSA-Formen voneinander zu unterscheiden. Die starke Bindung der letzteren läßt auf einen gegenüber dem 80 kDa Endprodukt erhöhten Mannosegehalt der Vorstufe schließen.

Die Bindung der Kohlenhydrate an die CSA-Polypeptidkette

Während die N-glykosidische Bindung der in der 68 kDa CSA-Vorstufe vorhandenen Kohlenhydrate durch ihre Endoglykosidasensitivität und ihr Fehlen in Tunicamycin-behandelten Zellen belegt ist, läßt sich aus den bisherigen Ergebnissen keine Aussage ableiten über den Bindungstyp der anderen Kohlenhydratreste, und zwar der Reste, durch die die 68 kDa Vorstufe in die 80 kDa Form und in Gegenwart von Tunicamycin die 53 kDa CSA-Vorstufe in die 66 kDa Form übergeführt wird. Zunächst ist darauf hinzuweisen, daß die Synthese der 66 kDa Form nicht absolut unempfindlich gegenüber Tunicamycin ist. Zwar kann durch Erhöhung der Tunicamycinkonzentration die Bildung der 66 kDa Form nicht verhindert werden, wohl aber durch Zugabe des Inhibitors zu einem früheren Zeitpunkt. Werden die Zellen nicht nur während der Entwicklung, sondern auch 4 Stunden vor deren Induktion mit Tunicamycin behandelt, so entsteht nur die 53 kDa Form (M.Yoshida, unveröffentlichte Ergebnisse). Dies konnte durch Bestimmung der 53 kDa und 66 kDa Formen in

Zellen, denen 4 Stunden vor dem Ende der Vermehrungsphase, oder 1 Stunde bzw. 2 Stunden nach dem Beginn der Entwicklung Tunicamycin zugesetzt worden war, bestätigt werden (Fig.12).

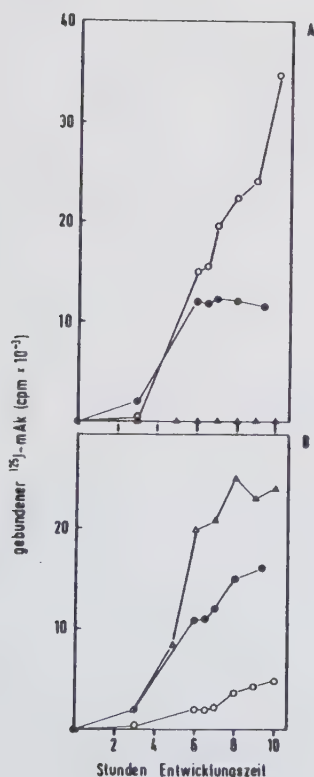


Fig.12 Abhängigkeit der Akkumulation der 53 kDa und 66 kDa CSA-Formen von der Dauer der Tunicamycinbehandlung

Wildtypzellen entwickelten sich in Anwesenheit von 0,4 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin, das 2 Stunden (offene Kreise) oder 1 Stunde (geschlossene Kreise) nach Beginn der Entwicklung gegeben wurde. In einer dritten Zellkultur (offene Dreiecke) war Tunicamycin in den letzten 4 Stunden der Vermehrungsphase vorhanden und wurde auch am Beginn der Entwicklung den Nährstoff-frei gewaschenen Zellen zugegeben. Zu bestimmten Zeiten wurden Proben, die 2×10^6 Zellen enthielten, entnommen, eine Membranfraktion hergestellt und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrocellulose transferiert, mit ^{125}I -mAk markiert und autoradiographiert. Die Banden, die das 66 kDa Glykoprotein (A) oder das 53 kDa Protein (B) enthielten, wurden ausgeschnitten und die gebundene Radioaktivität im γ -Zähler bestimmt.

Die Hemmung der Glykosylierung der 53 kDa Vorstufe durch Tunicamycin beweist nicht eine N-glykosidische Bindung der Kohlenhydrate in der 66 kDa Form. Die Inhibition könnte auch auf einen indirekten, nach längerer Einwirkungszeit auftretenden Effekt von Tunicamycin zurückzuführen sein. So könnte zum Beispiel die Aktivität von an der O-Glykosylierung beteiligter Transferasen durch die längere Tunicamycinbehandlung beeinträchtigt sein. Um einen weiteren Hinweis auf den Bindungstyp der Kohlenhydrate zu erhalten, wurde eine β -Eliminationsreaktion durchgeführt. Dies ist eine milde alkalische Behandlung von Glykoproteinen und Glykopeptiden, durch die normalerweise O-glykosidisch an Serin oder Threonin gebundene Zuckerreste abgespalten werden, wobei 2-Aminopropensäure (Dehydroalanin) bzw. 2-Amino-2-Butensäure entsteht. Diese Reaktion wird begünstigt durch die Ausbildung eines mesomeriestabilisierten Übergangszustandes, der im weiteren Verlauf der Reaktion zu einer Kohlenstoffdoppelbindung führt, die sich in β -Stellung zur Carboxylbindung befindet (Neuberger et al., 1972).

Es war geplant, die Abspaltung der mit mAk 12-120-94 (siehe Tab.1) reagierenden Kohlenhydrate im Immunoblot zu verfolgen, wobei die Reaktion der Polypeptidkette mit mAk 33-294-17 als Referenz dienen sollte. Es ergab sich, daß unter Bedingungen, unter denen das Kohlenhydrat-Epitop verschwand, auch die Bindung des anderen Antikörpers an die Polypeptidkette verloren ging (Fig.13). Daraus ist zu folgern, daß die Bindung der Kohlenhydrate an das Protein

mindestens so alkalistabil wie dieses selbst ist. Die Bedingungen, unter denen das Protein erhalten blieb (Fig.14), waren aber zu mild, um aus der Persistenz der Kohlenhydratreste auf eine N-glykosidische Bindung zu schließen.

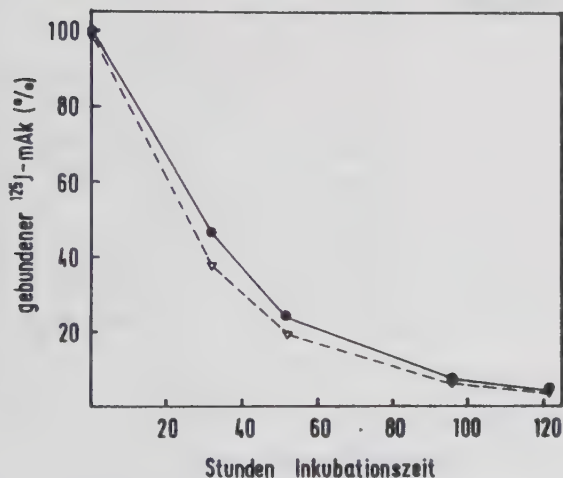


Fig.13 Die Bindung der Kohlenhydrate, die das Epitop für mAk 12-120-94 enthalten, an das Protein ist mindestens so alkalistabil wie dieses selbst

Membranen aggregationskompetenter Wildtypzellen wurden in 0,1 N NaOH resuspendiert, so daß die Lösung eine Proteinkonzentration von 4 mg/ml besaß. Nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten bei 4°C wurden Proben entnommen, durch Zugabe von HCL neutralisiert und in SDS-Probenpuffer gekocht. 1×10^6 Zellequivalente wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit mAk 12-120-94 (durchgezogene Linie) oder mAk 33-294-17 (gestrichelte Linie) markiert und autoradiographiert. Bereiche des Nitrozellulosefilters, die das 80 kDa Glykoprotein enthielten, wurden ausgeschnitten und die gebundene Radioaktivität im γ -Zähler bestimmt.

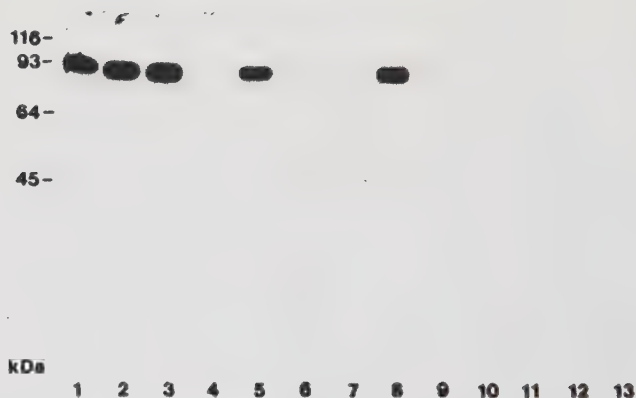


Fig.14 Das CSA-Glykoprotein ist sehr alkalilabil

Membranen aggregationskompetenter Wildtypzellen (1) wurden in 0,1 N (2-4, 8-10) oder 0,5 N NaOH (5-7, 11-13) resuspendiert, so daß die Lösung eine Proteinkonzentration von 4 mg/ml besaß. Sie wurde für 1 Stunde (2-7) oder 18 Stunden (8-13) bei 0°C (2,5,8,11), 22°C (3,6,9,12) oder 55°C (4,7,11,13) gehalten. Durch Zugabe von HCL wurde neutralisiert und in SDS-Probenpuffer gekocht. 1×10^6 Zellequivalente wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert, mit mAk 33-294-17 markiert und autoradiographiert. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind rechts angegeben.

Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Im Diskussionsteil der vorliegenden Arbeit werden die einzelnen Glykosylierungsschritte der CSA-Polypeptidkette ausführlich besprochen. Zum Verständnis der beiden folgenden Abschnitte, die sich mit der Sulfatierung und dem Transport des Glykoproteins zur Zelloberfläche befassen, ist es notwendig, thesenartig darzulegen, was aus den bisher erzielten Ergebnissen über die Glykosylierung der CSA geschlossen werden kann.

Das 80 kDa CSA-Glykoprotein ist mit zwei verschiedenen Typen von Kohlenhydraten modifiziert, die im folgenden Typ1 bzw. Typ2 genannt werden. Sie können voneinander unterschieden werden durch Markierung mit ConA, das nur den Typ1 erkennt und durch Markierung mit WGA und monoklonalen Antikörpern, die nur den Typ2 erkennen. Das apparente Molekulargewicht der CSA-Polypeptidkette beträgt 53 kDa. Die Modifizierung mit Typ1 Kohlenhydrat führt zur 68 kDa Vorstufe und erfolgt cotranslational. Die Übertragung von Typ2 Kohlenhydrat auf die 68 kDa Vorstufe erfolgt posttranslational, wodurch sich das apparente Molekulargewicht auf 80 kDa, den Wert des reifen CSA-Glykoproteins, erhöht. Tunicamycin verhindert die cotranslationale Glykosylierung. Dadurch wird statt der 68 kDa Vorstufe das unglykosylierte 53 kDa Protein als CSA-Vorstufe gebildet.

Die Modifikation der CSA mit Typ2 Kohlenhydrat kann auch in Abwesenheit von Typ1 Kohlenhydrat erfolgen, wodurch das 66 kDa Glykoprotein entsteht. Dieses ist die hauptsächlich

gebildete CSA-Form in Zellen, zu denen Tunicamycin während der Entwicklung kurz vor Beginn der CSA-Synthese gegeben wurde. Die posttranslationale Glykosylierung findet in der Mutante HL220 nicht statt, was zur Akkumulation der 68 kDa CSA-Form führt. Nach längerer Vorinkubation der Wildtypzellen mit Tunicamycin ist neben dem cotranslationalen auch der posttranslationale Glykosylierungsschritt inhibiert, so daß die CSA in ihrer unglykosylierten 53 kDa Form exprimiert werden.

Typ1 Kohlenhydrat ist N-glykosidisch an die 68 kDa CSA-Vorstufe gebunden, was durch die Sensitivität gegen Endoglykosidase F und H gezeigt ist. Dagegen ist die Art der Bindung von Typ2 Kohlenhydrat an die Polypeptidkette nicht sicher.

DIE SULFATIERUNG DES CSA-GLYKOPROTEINS

Das 80 kDa CSA-Glykoprotein und seine 68 kDa Vorstufe können zellfrei sulfatiert werden

PAPS wird als energiereiche Sulfatverbindung von Zellen als Sulfatdonor zur Protein- und Kohlenhydratsulfatierung genutzt (De Meio, 1975). In [^{35}S] Sulfat-markierten, aggregationskompetenten Zellen von *D.discoideum* konnte eine Verbindung nachgewiesen werden, die gleiche elektrophoretische und chromatographische Mobilitäten besaß wie authentisches PAPS (Fig.15). Mit Hilfe von exogenem [^{35}S] PAPS, das einem Homogenat aggregationskompetenter Zellen zugefügt worden war, konnten in dem Homogenat Sulfotransferasen nachgewiesen werden, die Sulfatreste von PAPS auf Proteine übertrugen (Fig.16A;1). Wurde [^{35}S] PAPS durch [^{35}S] Sulfat ersetzt, wurde keine Markierung der Proteine beobachtet (Fig.16A;2). Ein 100-facher molarer Überschuß von unmarkiertem Sulfat über [^{35}S] PAPS beeinflusste die Übertragung der [^{35}S] Sulfatreste von [^{35}S] PAPS auf die } Proteine nicht (Fig.16A;3). Diese beiden Kontrollen wurden durchgeführt um auszuschließen, daß durch Hydrolyse von [^{35}S] PAPS gebildetes [^{35}S] Sulfat von wenigen, unlysierten Zellen inkorporiert wurde, deren Anwesenheit im Zellhomogenat bei der mikroskopischen Kontrolle übersehen worden war.

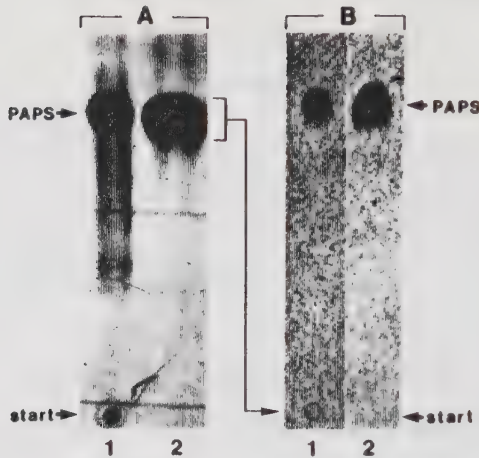


Fig.15 Nachweis von PAPS in aggregationskompetenten Zellen von *D. discoideum*

Ein Acetonextrakt von [35 S]Sulfat-markierten Wildtypzellen, die sich 4,5 Stunden entwickelt hatten, wurde mit unmarkiertem, authentischen PAPS versetzt und mittels Dünnschichtelektrophorese analysiert (A;1). Das Material, das mit dem unmarkierten PAPS comigrierte, wurde gesammelt, eluiert und mittels Dünnschichtchromathographie reanalysiert (B;1). Die Startpunkte und die Lage von PAPS sind in den gezeigten Autoradiogrammen angegeben. Ein [35 S]PAPS-Standard wurde in gleicher Weise elektrophoretisch aufgetrennt (A;2) und chromathographiert (B;2).

Es wurden nach SDS-PAGE 3 Paare von Proteinen bei 130 kDa und 115 kDa, bei 80 kDa und 68 kDa und bei 48 kDa und 44 kDa besonders stark zellfrei sulfatiert. Die [35 S]Sulfat-markierten Proteine bei 80 kDa und 68 kDa koinzidierten mit den 80 kDa und 68 kDa CSA-Formen des Wildtyps, die durch Markierung mit dem Protein-spezifischen anti-CSA Antikörper 33-294-17

nachgewiesen wurden (Fig.16B). Später wird durch 2D-PAGE gezeigt werden, daß diese beiden [^{35}S] Sulfat-markierten Proteine mit dem CSA-Glykoprotein und seiner Vorstufe identisch sind. Diese Ergebnisse zeigen, daß das 80 kDa CSA-Glykoprotein nach zellfreier Sulfatierung zu den am stärksten radioaktiv markierten Proteinen gehört. Es wurde früher durch Markierung ganzer, sich entwickelnder Zellen mit [^{35}S] Sulfat gezeigt, daß auch in vivo das CSA-Glykoprotein sehr stark sulfatiert wird (Stadler et al., 1983). Die zellfreie Sulfatierung der 68 kDa Vorstufe zeigt, daß diese bereits Sulfatakzeptorstellen besitzt. Obwohl die Vorstufe im Zellhomogenat in wesentlich geringerer Menge vorhanden war als das 80 kDa Endprodukt, waren beide CSA-Formen etwa gleich stark zellfrei [^{35}S] Sulfat-markiert. Die Ursache hierfür wird in den nächsten Experimenten deutlich werden.

Die zellfrei übertragenen [^{35}S] Sulfatreste der 68 kDa Vorstufe, des 80 kDa CSA-Glykoproteins und auch aller übrigen Proteine konnten durch eine Alkalibehandlung abgespalten und als Bariumsulfat präzipitiert werden (Tab.3). Die Alkalilabilität der Sulfatbindung zeigt, daß die Sulfatreste nicht an Tyrosin, die einzige bisher bekannte sulfatierte Aminosäure (Huttner, 1982; Huttner, 1984) und damit sehr wahrscheinlich nicht an die Polypeptidkette der CSA sondern an Kohlenhydrate gebunden sind. Da die nur Typ2 Kohlenhydrat enthaltende 66 kDa CSA-Form aus Tunicamycin-behandelten Zellen nicht sulfatiert ist (Stadler et al., 1983), muß man annehmen, daß sich die Sulfatakzeptorstellen auf Typ1 Kohlenhydrat befinden. Dies

wird durch die Sulfatierbarkeit der nur Typ 1 Kohlenhydrat enthaltenden 68 kDa CSA-Vorstufe bestätigt. Im Anhang (S. 154) wird durch Endoglykosidaseabbau belegt, daß sich die Sulfatreste tatsächlich auf N-glykosydisch gebundenen Kohlenhydratresten befinden. Die Sulfatierung bietet damit ein weiteres Kriterium zur Unterscheidung der beiden Kohlenhydrattypen des CSA-Glykoproteins.

	<u>gesamtes</u> <u>[³⁵S]Sulfat</u> cpm	<u>alkalistabiles</u> <u>[³⁵S]Sulfat</u> cpm
Wildtyp AX2		
80 kDa Glykoprotein	670	4
68 kDa Glykoprotein	640	0
alle anderen Proteine	8110	47
Mutante HL220		
68 kDa Glykoprotein	710	0
alle anderen Proteine	9620	102

Tab.3 Die zellfrei [³⁵S]Sulfat-markierten Proteine enthalten kein Tyrosin-[³⁵S]Sulfat

100 000xg Pelletfraktionen des Wildtyps AX2 und der Mutante HL220 wurden zellfrei sulfatiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und fluorographiert. Anhand des Fluorogramms wurden Gelstücke, die das 80 kDa oder 68 kDa Glykoprotein enthielten, ausgeschnitten. Aus diesen und aus dem nicht ausgeschnittenen Rest der Gele, der die übrigen Proteine enthielt, wurden die Proteine durch Pronaseabbau eluiert. Die Radioaktivität eines Aliquots von jedem Eluat wurde bestimmt und daraus das gesamte inkorporierte [³⁵S]Sulfat berechnet. Die Eluate wurden mit Bariumhydroxid inkubiert und anschließend durch Schwefelsäure neutralisiert. Nach Zentrifugation des präzipitierten Bariumsulfats wurde das im Überstand verbliebene [³⁵S]Sulfat, d.h. das in einer alkalistabilen Bindung in die Proteine inkorporierte Sulfat, bestimmt.

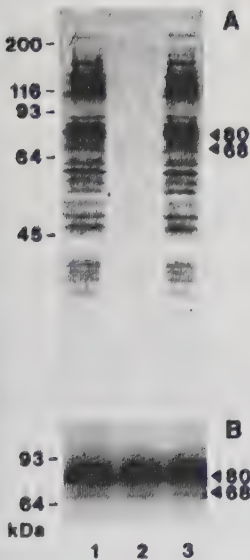


Fig.16 Zellfreie Proteinsulfatierung im Homogenat von *D. discoideum*

Homogenat aus 3×10^6 aggregationskompetenten Wildtypzellen wurde zellfrei sulfatiert. Spur 1, Standardansatz mit $10 \mu\text{M}$ [^{35}S]PAPS (2Ci/mmol); Spur 2, Standardansatz, aber [^{35}S]PAPS durch [^{35}S]Sulfat ersetzt; Spur 3, Standardansatz mit [^{35}S]PAPS zu dem 1 mM unmarkiertes Sulfat hinzugefügt wurde. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und fluorographiert. Anschließend wurde mit ^{125}J -mAk 33-294-17 markiert und autoradiographiert (B). Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen des 80 kDa Glykoproteins und des 68 kDa Glykoproteins sind rechts angegeben.

Verteilung der 68 kDa Vorstufe, des 80 kDa Glykoproteins und der Sulfatierungskapazität in Membranfraktionen

Um die Zellorganellen zu identifizieren, in denen die Glykosylierung mit Typ1 und Typ2 Kohlenhydrat erfolgt, wurden Membranfraktionen isoliert, in denen die Sulfotransferaseaktivität angereichert war. Da der Golgiapparat das zelluläre Kompartiment ist, in dem die Sulfatierung von Proteinen und Kohlenhydraten stattfindet (Farquahr und Palade, 1981), sollten in der Golgi-Fraktion auch Vorstufen der sulfatierten CSA angereichert sein, die auf dem Weg zur Plasmamembran gerade den Golgiapparat passieren.

	<u>Homogenat</u>	<u>10 000xg Pellet</u>	<u>100 000xg Pellet</u>	<u>100 000xg Überstand</u>
Protein	0,625	0,176 (27%)	0,162 (25%)	0,368 (56%)
Phosphodiesterase				
gesamte Aktivität	0,342	0,192 (56%)	0,073 (21%)	0,038 (11%)
spezif. Aktivität	0,524	1,091	0,471	0,103
alkalische Phosphatase				
gesamte Aktivität	0,381	0,140 (37%)	0,060 (16%)	0,176 (46%)
spezif. Aktivität	0,584	0,795	0,370	0,478
5'-Nucleotidase				
gesamte Aktivität	0,168	0,187 (111%)	0,038 (23%)	<0,001 (<1%)
spezif. Aktivität	0,258	1,063	0,2	<0,003
α -Mannosidase				
gesamte Aktivität	1,544	0,536 (35%)	0,304 (20%)	0,888 (57%)
spezif. Aktivität	3,216	3,045	1,876	2,413
Succinatdehydrogenase				
gesamte Aktivität	15,66	15,96 (100%)	0,010 (<1%)	0,010 (<1%)
spezif. Aktivität	24,00	90,68	0,730	0,390
NADPH Cytochrome C- Reduktase				
gesamte Aktivität	4,01	4,20 (104%)	0,55 (14%)	1,33 (32%)
spezif. Aktivität	6,41	23,89	3,40	3,63

Tab.4 Verteilung von Markerenzymen in subzellulären Fraktionen nach differentieller Zentrifugation

Protein und enzymatische Aktivitäten wurden, wie im Methodenteil beschrieben, bestimmt. Der Proteinwert gibt die Menge in mg pro 1×10^7 Zellen an. Die Gesamtaktivität gibt die Menge Substrat in nmol an, die in 1 Minute vom Homogenat oder subzellulären Fraktionen, die aus 1×10^7 Zellen stammten, umgesetzt wurden. Die spezifischen Aktivitäten wurden durch Division der gesamten Aktivität durch die entsprechenden Proteinwerte erhalten. Jeder Wert stellt den Mittelwert mindestens zweier Messungen dar.

Ein Homogenat aggregationskompetenter Zellen wurde durch eine 10 000xg Zentrifugation und anschließend durch eine 100 000xg Zentrifugation des Überstandes fraktioniert (Fig.17). Die 10 000xg Pelletfraktion war angereichert an membrangebundener alkalischer Phosphatase, 5'-Nukleotidase, membrangebundener cyclo-AMP Phosphodiesterase, Succinatdehydrogenase und NADPH Cytochrom c-Reduktase. Etwa 35% der in den Zellen vorhandenen α -Mannosidaseaktivität wurde ebenfalls in dieser Fraktion gefunden (Tab.4). Homogenat und

subzelluläre Fraktionen wurden auf Sulfotransferase-katalysierte Übertragung von [35 S] Sulfat von exogenem [35 S] PAPS auf endogene Proteine untersucht (Fig.18A). Diese Sulfatübertragung hängt von mindestens drei Parametern ab: der Zugänglichkeit des exogenen PAPS zu den Sulfotransferasen (die bei geschlossenen Vesikeln die Aktivität einer Translokase erfordert), der Aktivität dieser Enzyme und der Menge an Akzeptorproteinen. Der Begriff "endogene Sulfatierungskapazität" soll die Summe aller Bedingungen umfassen, die für die zellfreie Sulfatübertragung notwendig und hinreichend sind.

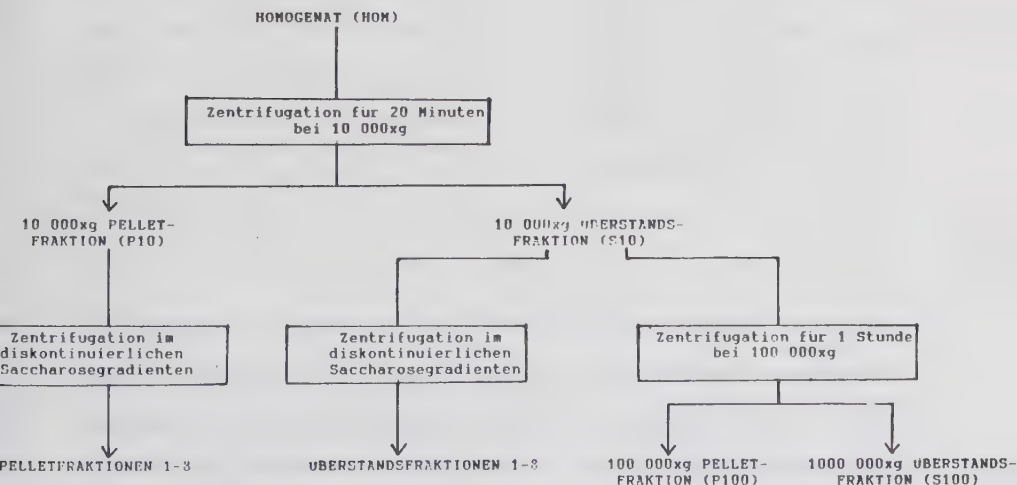


Fig.17 Fraktionierung des Zellhomogenates durch differentielle Zentrifugation und Zentrifugation im diskontinuierlichen Saccharosegradienten

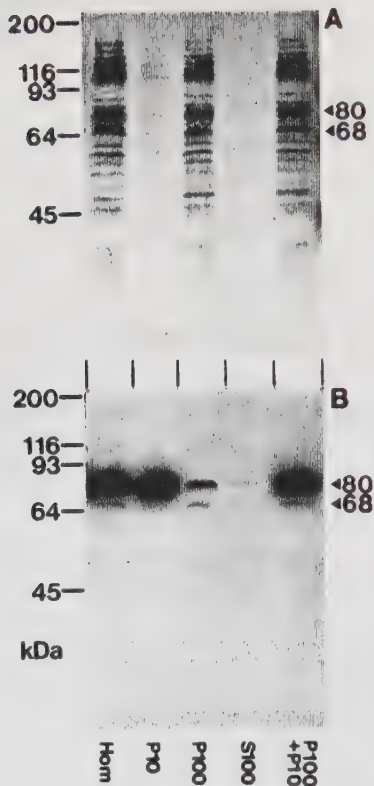


Fig.18 Verteilung von zellfreier Sulfatierungskapazität (A) sowie des 80 kDa und 68 kDa Glykoproteins (B) nach differentieller Zentrifugation

Ein Homogenat (Hom) von aggregationskompetenten Wildtypzellen wurde durch Zentrifugation bei 10 000xg in ein Pellet (P10) und einen Überstand fraktioniert. Letzterer wurde bei 100 000xg weiter fraktioniert in ein Pellet (P100) und einen Überstand (S100). 3×10^6 Zellen entsprechende Mengen des Homogenates und jeder Fraktion wurden allein oder in Kombination im Standardansatz zellfrei sulfatiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und fluorographiert (A). Anschließend wurde mit $^{125}\text{J-mAk 33-294-17}$ markiert und autoradiographiert (B). Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen des 80 kDa Glykoproteins und des 68 kDa Glykoproteins sind rechts angegeben.

Die endogene Sulfatierungskapazität des Homogenates (Fig.18A;1) wurde fast vollständig in der 100 000xg Pelletfraktion wiedergefunden (Fig.18A;3). Keine endogene Sulfatierungskapazität wurde in der 100 000xg Überstandsfraktion (Fig.18A;4), nur wenig in der 10 000xg Pelletfraktion gefunden (Fig.18A;2). Wurden die 10 000xg Pelletfraktion und 100 000xg Pelletfraktion zusammen mit ^{35}S PAPS inkubiert, war das Muster der markierten Proteine mit dem

der allein [^{35}S]PAPS inkubierten 100 000xg Pelletfraktion identisch (Fig.18A;5). Die Hauptmenge des 80 kDa Glykoproteins wurde nach Markierung mit dem Protein-spezifischen anti-CSA Antikörper 33-294-17 in der 10 000xg Pelletfraktion (Fig.18B;1,2), das 68 kDa Glykoprotein fast quantitativ in der 100 000xg Pelletfraktion nachgewiesen (Fig.18B;3). In der löslichen Fraktion war keines der beiden Proteine vorhanden (Fig.18B;4).

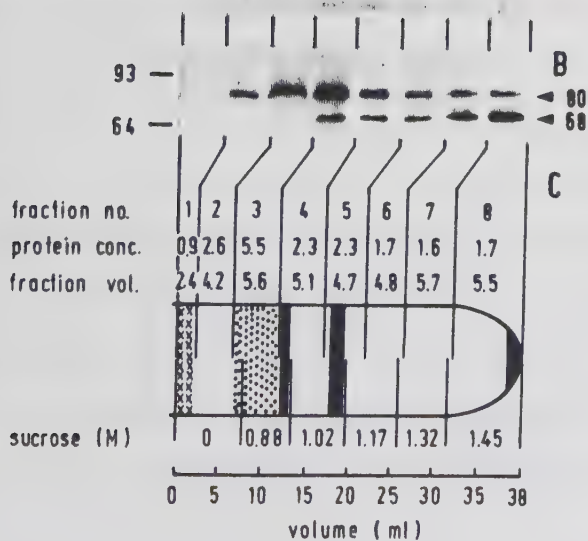
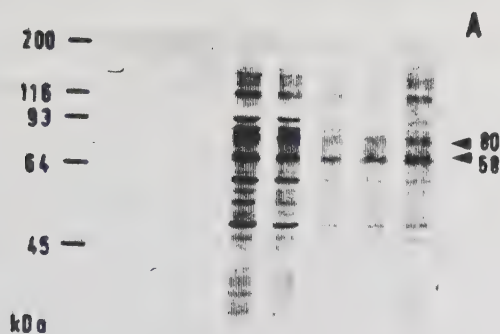
Die Membranen, die im Überstand der 10 000xg Zentrifugation verblieben waren, wurden durch eine Zentrifugation im diskontinuierlichen Saccharosegradienten weiter aufgetrennt (Fig.19C). Den höchsten Gehalt an 68 kDa Protein hatte die Pelletfraktion des Saccharosegradienten (Fraktion 8) (Fig.19B). Der höchste Gehalt an endogener Sulfatierungskapazität dagegen wurde in Membranen nachgewiesen, die sich auf der 0,88/1,02 M Saccharosestufe sammelten (Fraktion 4) (Fig.19A). Diese Membranen wiesen gleichzeitig den höchsten Gehalt an 80 kDa Glykoprotein unter allen Membranen des 10 000xg Überstandes auf (Fig.19B).

Aus den eben dargelegten Ergebnissen können folgende Schlüsse über die subzelluläre Verteilung der endogenen Sulfatierungskapazität, des 80 kDa CSA-Glykoproteins sowie seiner 68 kDa Vorstufe gezogen werden: Die 100 000xg Pelletfraktion, in der sich der größte Teil der endogenen Sulfatierungskapazität befindet, ist weitgehend frei von Plasmamembranen. Diese sedimentieren in die 10 000xg Pelletfraktion, was durch die Anreicherung der Plasma-

membranmarker alkalische Phosphatase (Gilkes und Weeks, 1977), cyclo-AMP Phosphodiesterase (Malchow et al., 1972) und 5'-Nukleotidase (Gilkes und Weeks, 1977) in dieser Fraktion gezeigt ist. Außerdem werden hier die Mitochondrien und ein Teil der Lysosomen durch die Markerenzyme Succinatdehydrogenase (De Duve et al., 1955) bzw. α -Mannosidase (Wood und Kaplan, 1985) identifiziert.

Fig.19 Verteilung von zellfreier Sulfatierungskapazität (A) sowie des 80 kDa und 68 kDa Glykoproteins (B) in Fraktionen, die durch diskontinuierliche Saccharosegradientenzentrifugation (C) einer 10 000xg Überstandsfraktion des Wildtyps erhalten wurde

Die Positionen der verschiedenen Zonen, in die die 10 000xg Überstandsfraktion eines Wildtypomogenates aufgetrennt wurde, sind innerhalb des Zentrifugenröhrchens (C) gezeigt: schraffierter Bereich, "milchige" oberste Schicht; gepunkteter Bereich, gelbliche, durchscheinende Schicht im 0/0,88 M Saccharosebereich; schwarze Zonen, Banden auf den 0,88/1,02 und 1,02/1,17 M Saccharosestufen und Pellet. Eine Volumenskala und die Molaritäten der Saccharoseschichten sind unterhalb des Zentrifugenröhrchens angegeben. Darüber sind die Volumina und die Proteinkonzentrationen der Fraktionen, in die der Gradient nach der Zentrifugation aufgeteilt wurde, aufgeführt. Ein Aliquot jeder Fraktion, das 0,4% jeder Gesamtfraktion entsprach, wurde im Standard Sulfatierungsansatz zellfrei sulfatiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und fluorographiert (A). Ein Duplikat dieses Filters wurde mit $^{125}\text{J-mAk 33-294-17}$ markiert und autoradiographiert (B). Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links angegeben, die Positionen des 80 kDa Glykoproteins und des 68 kDa Glykoproteins sind rechts angegeben.



Die Membranen, die endogene Sulfatierungskapazität enthalten, sammeln sich auf der 0,88/1,02 Saccharosestufe und besitzen damit eine für Membranen des Golgiapparates typische Dichte (Beaufay und Amar-Costesec, 1976). Es kann also davon ausgegangen werden, daß in *D.discoideum*, wie in anderen eukaryontischen Zellen, die Proteinsulfatierung im Golgiapparat stattfindet.

Das 80 kDa CSA-Glykoprotein, aber nicht seine 68 kDa Vorstufe, sedimentiert mit der an Plasmamembranen angereicherten 10 000xg Pelletfraktion. Die Vorstufe befindet sich überwiegend in Membranen, die eine so hohe Dichte besitzen, daß sie durch 1,45 M Saccharose hindurch sedimentieren. Die hohe Dichte dieser Membranen spricht dafür, daß sie aus dem rauen ER stammen (Beaufay und Amar-Costesec, 1976). NADPH Cytochrom c-Reduktase, die in Leberzellen der Ratte als Marker für ER etabliert ist (Grinna und Robbins, 1979), ist nicht in dieser Membranfraktion angereichert. Dieses Enzym wird in der 10 000xg Pelletfraktion nachgewiesen und ist, wie die Zentrifugation im Saccharosegradienten zeigen wird (Fig.27), in Membranen angereichert, deren geringe Dichte ihre Herkunft aus dem rauen ER ausschließt. NADPH Cytochrom c-Reduktase ist also in *D.discoideum* für die Identifizierung des rauen ER ungeeignet.

Die zellfreie [³⁵S]Sulfatmarkierung des 80 kDa CSA-Glykoproteins war in der 100 000xg Pelletfraktion kaum geringer als im Homogenat. Auch die gemeinsame Inkubation

der 10 000xg Pelletfraktion, in der sich der größte Teil der CSA befand, und der 100 000xg Pelletfraktion mit [35 S]PAPS erhöhte die Intensität der [35 S]Sulfat-markierten Bande nicht. Hieraus folgt, daß die mit der 10 000xg Pelletfraktion sedimentierende 80 kDa CSA-Form zellfrei nicht sulfatiert werden kann.

Die Tatsache, daß ausschließlich die mit der 100 000xg Pelletfraktion sedimentierenden CSA zellfrei sulfatiert werden können, deutet darauf hin, daß ihr Vorkommen in dieser Fraktion nicht auf einer Kontamination durch Plasmamembranen beruht. Es könnten CSA-Moleküle sein, die sich auf dem Weg zur Plasmamembran im Golgiapparat befinden. Wenn diese Vermutung richtig ist, sollte während der Entwicklung das CSA-Glykoprotein in dieser Fraktion nicht parallel mit dem CSA-Gehalt des Homogenates akkumulieren. Um dies zu untersuchen, wurden Homogenate und 100 000xg Pelletfraktionen von Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien auf ihren Gehalt an 68 kDa und 80 kDa Protein untersucht (Fig.20). Die Analyse der Homogenate zeigt, daß der Gehalt an 80 kDa Glykoprotein zwischen 4,5 und 6,5 Stunden Entwicklungszeit anstieg. Während nach 4,5 Stunden die Hauptmenge dieses Proteins in der 100 000xg Pelletfraktion wiedergefunden wurde, trat es nach 6,5 Stunden nur zu einem kleinen Teil in dieser Fraktion auf. Dies bedeutet, daß das 80 kDa Glykoprotein in der 10 000xg Pelletfraktion akkumulierte. Dieser Befund bestätigt, daß das Vorkommen dieses Glykoproteins in der 100 000xg Pelletfraktion nicht auf einer Verunreinigung dieser Fraktion durch Plasmamembranen beruht.

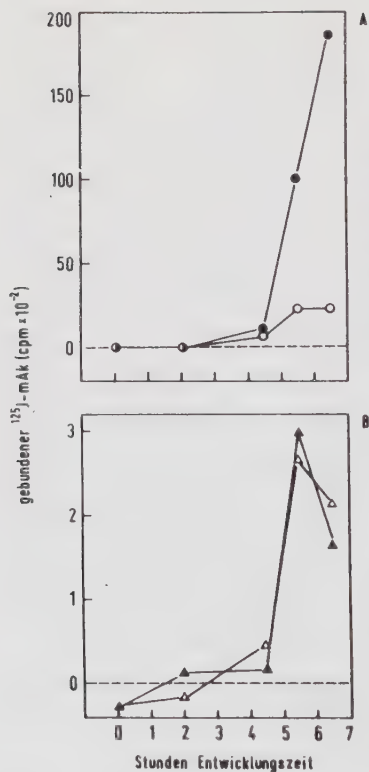


Fig.20 Quantifizierung des CSA-Glykoproteins (A) und der 68 kDa Vorstufe (B) im Zellhomogenat (geschlossene Symbole) und in der 100 000xg Pelletfraktion (offene Symbole) zu verschiedenen Zeiten nach Induktion der Entwicklung

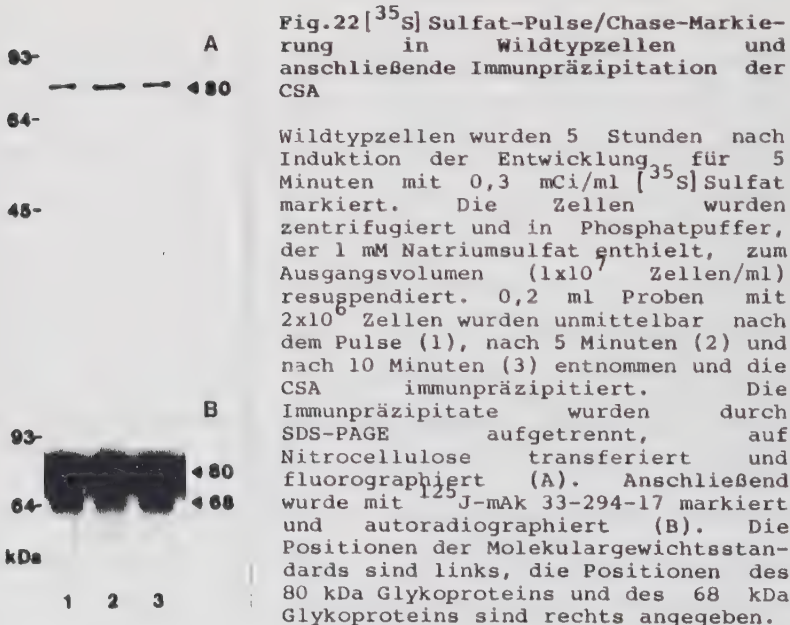
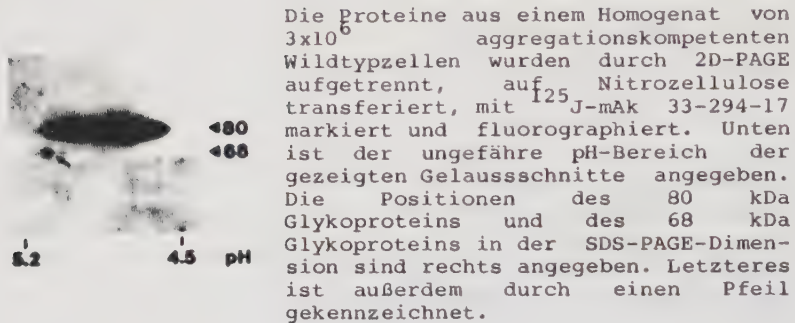
Wildtypzellen wurden zu verschiedenen Zeiten nach Induktion der Entwicklung geerntet. Homogenate und 100 000xg Pelletfraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert, mit $^{125}\text{J-mAk}$ 33-294-17 markiert und autoradiographiert. Es wurden pro Spur Proteilmengen aufgetragen, die $2,5 \times 10^6$ Zellen des Homogenates und 1×10^7 Zellen der 100 000xg Pelletfraktion entsprachen. Die Positionen der 80 kDa und 68 kDa Glykoproteine wurden durch Autoradiographie identifiziert. Bereiche des Filters, die diese Banden enthielten, wurden ausgeschnitten und deren ^{125}J Jodmarkierung im γ -Zähler quantifiziert.

Im Gegensatz zum 80 kDa Glykoprotein nahm die Menge an 68 kDa Glykoprotein nur zwischen 4,5 Stunden und 5,5 Stunden Entwicklungszeit zu. Über die gesamte untersuchte Entwicklungszeit hinweg wurden signifikante Mengen des 68 kDa Glykoprotein nur in der 100 000xg Pelletfraktion gefunden. Dieses Resultat unterstützt die Annahme, daß dieses Glykoprotein nicht als solches zur Plasmamembran transportiert wird, sondern eine im Golgiapparat in das 80 kDa Glykoprotein umgewandelte Vorstufe darstellt.

Der größte Teil der 68 kDa CSA-Vorstufe liegt in der Zelle in nicht sulfatierter Form vor

Die 80 kDa Form des CSA-Glykoproteins ist isoelektrisch heterogen. Es können etwa 8-10 isoelektrische Varianten, die zwischen pH 5,1 und 4,7 fokussieren, in der horizontalen Dimension der 2D-PAGE unterschieden werden (Murray et al., 1981; Coffman et al., 1982; Stadler et al., 1983). Die unglykosylierten 53 kDa und 66 kDa CSA-Formen sind nicht sulfatiert (Stadler et al., 1983), isoelektrisch homogen und fokussieren bei pH 5,1 (Bertholdt et al., 1985). In einer Mutante mit stark reduzierter Sulfatierung und in Wildtypzellen, die mit Chlorat als Sulfatierungsinhibitor behandelt worden sind, akkumulieren unsulfatierte Formen des CSA-Glykoproteins, die bei pH 5,1 fokussieren (siehe Anhang, Fig.52; Fig.53; Fig.56). Diese Beobachtungen zeigen, daß die Sulfatierung der CSA die Ursache ihrer isoelektrischen Heterogenität ist.

Fig.21 Die 68 kDa CSA-Vorstufe des Wildtyps ist isoelektrisch weitgehend homogen

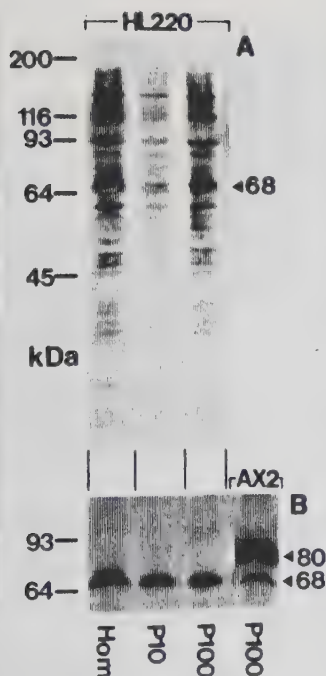


Die 68 kDa CSA-Vorstufe ist isoelektrisch homogen und fokussiert bei pH 5,1 (Fig.21). Sie ist also nicht sulfatiert. Dies geht auch aus einem Experiment hervor, bei dem aggregationskompetente Wildtypzellen mit [^{35}S] Sulfat 5 Minuten lang Pulse-markiert wurden. Die Pulsdauer wurde so gewählt, daß sie der Lebensdauer der 68 kDa Vorstufe entspricht (siehe Fig.5). Eine darüber hinausgehende Inkubationszeit mit [^{35}S] Sulfat würde die radioaktive Markierung der Vorstufe nicht erhöhen. Statt dessen würde sie immer mehr in den Hintergrund der anderen [^{35}S] Sulfat-markierten Proteine treten, die eine geringere turn-over-Rate besitzen. Nach verschiedenen Chase-Zeiten wurde die 68 kDa Vorstufe und auch das 80 kDa Glykoprotein mit mAk 41-71-21 immunpräzipitiert (Fig.22B). Die radioaktive Markierung war sowohl unmittelbar am Ende des [^{35}S] Sulfatpulses (Fig.22A;1), als auch nach 5 und 10 Minuten Chase-Zeit (Fig.22A;2,3) ausschließlich im 80 kDa Glykoprotein erkennbar. Die 68 kDa CSA-Vorstufe liegt also überwiegend oder ausschließlich in unsulfatierter Form in der Zelle vor. Die nächsten Experimente werden zeigen, daß tatsächlich ein kleiner Anteil der Vorstufe nicht sulfatiert ist. Dieser Anteil ist so gering, daß er in den bisherigen Experimenten nicht gefunden wurde.

Die 68 kDa CSA-Form der Mutante HL220 unterscheidet sich von der 68 kDa CSA-Vorstufe des Wildtyps durch einen höheren Grad der Sulfatierung

Die Mutante HL220 synthetisiert anstelle des 80 kDa CSA-Glykoproteins eine 68 kDa CSA-Form (siehe S.37 Tab.2; Gerisch et al., 1985a), der wie der 68 kDa CSA-Vorstufe des Wildtyps Typ2 Kohlenhydrat fehlt. Um festzustellen, ob die 68 kDa Vorstufe mit dem 68 kDa CSA-Produkt der Mutante HL220 nicht nur in Bezug auf das Molekulargewicht und das Fehlen von Typ2 Kohlenhydrat, sondern auch in Hinblick auf die zellfrei sulfatierten Produkte identisch ist, wurde eine zellfreie Sulfatierung durchgeführt (Fig.23A). Dafür wurden endogene Enzyme und Substrate der Mutante verwendet. Wie im Wildtyp (Fig.18) befand sich die endogene Sulfatierungskapazität der Mutante nach Fraktionierung des Homogenates (Hom) hauptsächlich in der 100 000xg Pelletfraktion (P100). Das inkorporierte [³⁵S]Sulfat war nicht an Tyrosin gebunden (S.66, Tab.3). Im Sulfatierungsmuster fehlte erwartungsgemäß die 80 kDa Bande, während die 68 kDa Bande vorhanden war. Die Antikörpermarkierung zeigt (Fig.23B), daß das 68 kDa Glykoprotein in etwa gleicher Menge in der 10 000xg Pelletfraktion und in der 100 000xg Pelletfraktion vorlag. Hierin unterschied sich die Mutante vom Wildtyp, bei dem die 68 kDa Vorstufe nicht in die mit Plasmamembranen angereicherte 10 000xg Pelletfraktion gelangt.

Fig.23 Zellfreie Proteinsulfatierung und Vorkommen des 68 kDa Glykoproteins im Homogenat und in Fraktionen der Mutante HL220 nach differentieller Zentrifugation



Aus einem Homogenat von Zellen der Mutante HL220 (Hom) wurde durch differentielle Zentrifugation eine 10 000xg Pelletfraktion (P10) und eine 100 000xg Pelletfraktion (P100) hergestellt. Homogenat und subzelluläre Fraktionen wurden zellfrei sulfatiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und fluorographiert (A). Anschließend wurde mit $^{125}\text{J-mAk 33-294-17}$ markiert und autoradiographiert (B). Zum direkten Vergleich der Antikörper-markierten Mutanten- und Wildtyp-Produkte wurde eine 100 000xg Pelletfraktion des Wildtyps im gleichen Gel aufgetrennt (rechte Spur in B). Die pro Spur aufgetragenen Proteine stammen aus 1×10^7 Zellen. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen des 80 kDa Glykoproteins und des 68 kDa Glykoproteins sind rechts angegeben.

Die Membranen der Mutante, die nach der 10 000xg Zentrifugation im Überstand verblieben waren, wurden mit Hilfe eines diskontinuierlichen Saccharosegradienten in gleicher Weise wie Wildtypmembranen (Fig.19) weiter aufgetrennt. Wie im Wildtyp sammelten sich die Membranen, die den höchsten Gehalt an endogener Sulfatierungskapazität besaßen, auf der 0,88/1,02 M Saccharosestufe (Fig.24A,

Fraktion 4). Diese Membranen wiesen auch gleichzeitig den höchsten Gehalt an 68 kDa Glykoprotein auf (Fig.24B, Fraktion 4).

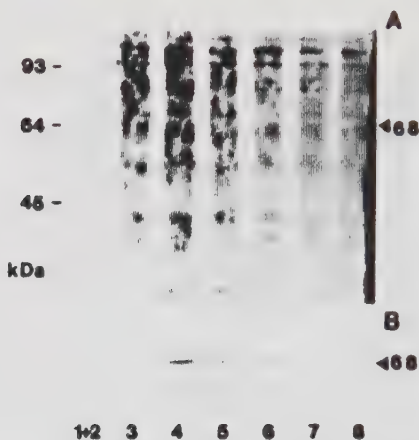


Fig.24 Die Verteilung der zellfreien Sulfatierungskapazität (A) und des 68 kDa Glykoproteins (B) in Fraktionen, die durch diskontinuierliche Saccharosegradientenzentrifugation einer 10 000xg Überstandsfraktion der Mutante HL220 erhalten wurden

Eine 10 000xg Überstandsfraktion der Mutante HL220 wurde in dem in Fig.19 beschriebenen Saccharosegradienten aufgetrennt. Die Fraktionen 1 und 2 in Fig.19 sind in einer Fraktion zusammengefaßt. Mengen, die 0,4% jeder Fraktion entsprachen, wurden im Standardansatz zellfrei sulfatiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und fluorographiert (A). Anschließend wurde mit ^{125}I -mAk 33-294-17 markiert und autoradiographiert (B). Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Position des 68 kDa Glykoproteins ist rechts angegeben.

Die durch zellfreie Sulfatierung erhaltenen Produkte der 68 kDa Formen des Wildtyps und der Mutante wurden durch

2D-PAGE auf ihre Identität geprüft. Hierfür wurden 100 000xg Pelletfraktionen der beiden Stämme [^{35}S] Sulfat-markiert und entweder einzeln oder gemeinsam aufgetrennt. In beiden Fällen konnten bis zu 9 [^{35}S] Sulfat-markierte isoelektrische Varianten unterschieden werden (Fig.25A, links und mitte). Die Zahl der Varianten änderte sich nicht, wenn Wildtyp- und Mutantenmaterial zusammen elektrophoresiert wurde (Fig.25A, rechts), was darauf schließen läßt, daß sich die Varianten des Wildtyps und der Mutante durch dieselben diskreten Ladungsbeiträge von einer nicht sulfatierten Grundform unterscheiden. Wie Fig.25A (rechts) zeigt, koinzidieren die zellfrei sulfatierten Formen des 80 kDa Glykoproteins des Wildtyps in der Fokussierungsrichtung mit den 68 kDa Formen der Vorstufe, die noch nicht mit Typ2 Kohlenhydrat modifiziert sind. Hieraus ist zu schließen, daß dieser Kohlenhydrattyp ungeladen ist. Diese Folgerung wird durch den Befund bestätigt, daß die unglykosylierte 53 kDa und die nur mit Typ2 Kohlenhydrat versehene 66 kDa CSA-Form aus Tunicamycin-behandelten Zellen den gleichen isoelektrischen Punkt besitzen (Bertholdt et al., 1985).

Die Markierung mit ^{125}J -mAk 33-294-17 zeigt, daß ein sehr geringer Anteil der 68 kDa Vorstufe des Wildtyps in isoelektrische Varianten aufgetrennt wird (Fig.25C, links), während die 68 kDa Formen der Mutante isoelektrisch heterogen wie die 80 kDa Form des Wildtyps ist (Fig.25C, mitte). Hieraus geht hervor, daß sich die 68 kDa Formen des Wildtyps und der Mutante durch den Grad ihrer Sulfatierung unterscheiden, wenn man davon ausgeht, daß die isoelektri-

sche Heterogenität durch die Sulfatierung bedingt ist (siehe S.152). Während die Vorstufe des Wildtyps zum größten Teil unsulfatiert ist, ist das Mutantenprodukt in etwa gleichem Ausmaß sulfatiert wie das 80 kDa Glykoprotein des Wildtyps in der in der 100 000xg Pelletfraktion vorliegenden Form.

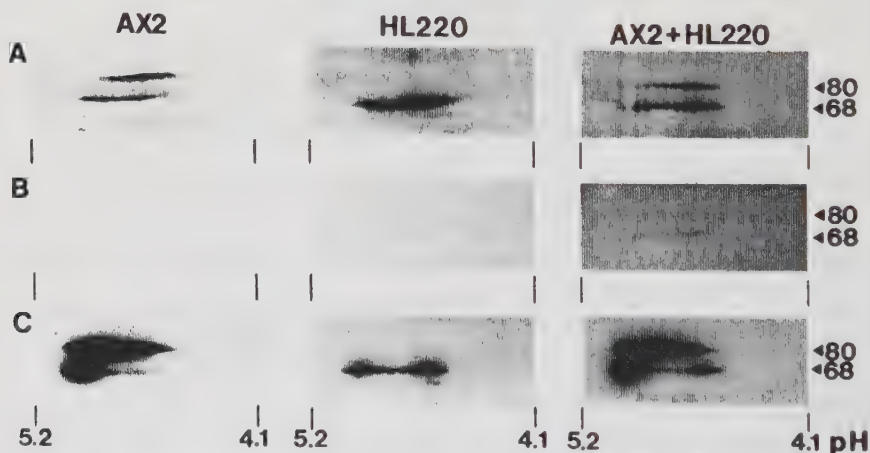


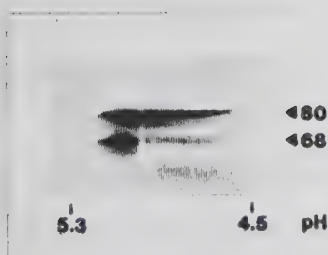
Fig.25 Isoelektrische Varianten der 68 kDa und 80 kDa Glykoproteine des Wildtyps und des 68 kDa Glykoproteins der Mutante HL220 nach zellfreier Sulfatierung

Nach zellfreier Sulfatierung im Standardansatz wurden 100 000xg Pelletfraktionen des Wildtyps (AX2) und der Mutante (HL220) sowie deren Kombination (AX2+HL220) durch 2D-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrocellulose transferiert und inkorporiertes $[^{35}\text{S}]$ Sulfat durch 8-tägige Fluorographie detektiert (A). PPO wurde entfernt und die Filter für 2 Tage autoradiographiert (B), bevor sie mit $^{125}\text{J-mAb 33-294-17}$ inkubiert und für 1 Tag autoradiographiert wurden (C). Zur Anreicherung der 80 kDa und 68 kDa Glykoproteine wurden die 100 000xg Pelletfraktionen nach der zellfreien Sulfatierung mit Octyloligooxyäthylen extrahiert. Der pro Gel aufgetragene Extrakt entstammte 7×10^7 Wildtypzellen, 14×10^7 Zellen der Mutante HL220 und je 7×10^7 Zellen der Wildtyp/Mutanten Kombination. Unten ist der ungefähre pH-Bereich der gezeigten Gelausschnitte angegeben. Die Positionen der 80 kDa und 68 kDa Glykoproteine in der SDS-PAGE-Dimension sind rechts angegeben.

Dieses Ergebnis entspricht der Erwartung, wenn man berücksichtigt, daß beim Wildtyp die Sulfatierung hauptsächlich nach der Bindung des Typ2 Kohlenhydrates an das Protein erfolgt, während bei der Mutante dieser Glykosylierungsschritt unterbunden ist und somit die 68 kDa Form im Golgiapparat weiter sulfatiert wird.

Im übrigen bestätigt die Koinzidenz der [^{35}S] Sulfatmarkierten isoelektrischen Varianten mit den vom Antikörper markierten Varianten (Fig.25, rechts) die Identität der zellfrei im Wildtypomogenat [^{35}S] Sulfat-markierten 80 kDa und 68 kDa Proteine mit dem CSA-Glykoprotein und seiner Vorstufe.

Fig.26 Isoelektrische Varianten der 68 kDa und 80 kDa Glykoproteine des Wildtyps vor der zellfreien Sulfatierung



Aus einer 100 000xg Pelletfraktion des Wildtyps, die nicht zellfrei sulfatiert worden war, wurde wie in Fig.25 beschrieben ein Detergenzextrakt hergestellt und durch 2D-PAGE aufgetrennt. Der aufgetragene Extrakt entstammte 7×10^7 Wildtypzellen. Unten ist der ungefähre pH-Bereich der gezeigten Gelausschnitte angegeben. Die Positionen der 80 kDa und 68 kDa Glykoproteine in der SDS-PAGE-Dimension sind rechts angegeben.

Es sei darauf hingewiesen, daß die geringe Menge an aciden Varianten der 68 kDa CSA-Form beim Wildtyp nicht erst

durch die zellfreie Sulfatierungsreaktion entsteht, sondern bereits in der Zelle vorhanden ist (Fig.26). Die bei der zellfreien Sulfatierung umgesetzte Menge an 68 kDa und 80 kDa Glykoprotein ist so gering, daß sie das Mengenverhältnis der isoelektrischen Varianten nicht merklich verschiebt.

DER EINFLUSS DER TYP1 UND TYP2 KOHLENHYDRATE AUF DEN INTRAZELLULÄREN TRANSPORT UND DIE STABILITÄT DER CSA

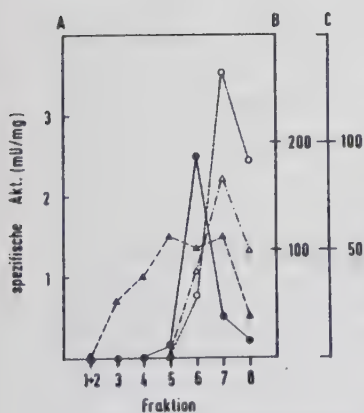
Das CSA- Glykoprotein vermittelt die EDTA-stabile Adhäsion, die in Aggregaten von *D.discoideum* Zellen gefunden wird (Müller und Gerisch, 1978). Um diese Aufgaben erfüllen zu können, muß das Glykoprotein vom rauhen ER, dem Ort seiner Synthese, auf die Zelloberfläche transportiert werden. Ob und inwieweit für diesen Transport die Modifikation des CSA-Proteins durch Typ1 oder Typ2 Kohlenhydrat notwendig ist, wurde in den folgenden Experimenten untersucht. Dazu wurde die Akkumulation der vollständig, partiell und nicht glykosylierten CSA-Formen auf der Zelloberfläche bestimmt.

In Wildtypzellen ist das 80 kDa Glykoprotein und in Tunicamycin-behandelten Zellen das 66 kDa Glykoprotein, aber nicht das 53 kDa Protein, in einer mit Plasmamembranen angereicherten Saccharosegradientenfraktion akkumuliert

In Fig.18 wurde gezeigt, daß nach differentieller Zentrifugation eines Homogenates aggregationskompetenter Wildtypzellen die Plasmamembranen und der größte Teil des 80

kDa Glykoproteins in der 10 000xg Pelletfraktion gefunden werden. Diese Membranfraktion wurde durch Zentrifugation in einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten, wie dem in Fig.19 gezeigten, subfraktioniert. Die Membranen auf der 1,17/1,32 M Saccharosestufe besaßen die höchste spezifische Aktivität an alkalischer Phosphatase (Fig.27;Fraktion 6). Succinatdehydrogenase und NADPH Cytochrom c-Reduktase waren in Membranen, die sich auf der 1,32/1,45 M Saccharosestufe sammelten, angereichert (Fig.27;Fraktion 7), während die spezifische Aktivität von α -Mannosidase über die Fraktionen, die von 1,17 bis 1,45 M Saccharose reichten, etwa gleichmäßig verteilt war (Fig.27;Fraktionen 5-7).

Fig.27 Verteilung von Leitenzymen in Fraktionen, die durch diskontinuierliche Saccharosegradientenzentrifugation einer 10 000xg Pelletfraktion des Wildtyps erhalten wurde



Wildtypzellen wurde nach 6 Stunden Entwicklungszeit geerntet und lysiert. Aus dem Homogenat wurde eine 10 000xg Pelletfraktion hergestellt und diese im diskontinuierlichen Saccharosegradienten aufgetrennt. Es wurde der in Fig.19 gezeigte Gradient verwendet. Die Fraktionen 1 und 2 der Fig.19 sind in einer Fraktion zusammengefaßt. Es wurden die spezifischen Aktivitäten von alkalischer Phosphatase (geschlossene Kreise), α -Mannosidase (geschlossene Dreiecke), Succinatdehydrogenase (offene Kreise) und NADPH Cytochrom c-Reduktase (offene Dreiecke) wie im Methodenteil beschrieben bestimmt. Skala A bezieht sich auf alkalische Phosphatase und α -Mannosidase, Skala B auf Succinatdehydrogenase und Skala C auf NADPH Cytochrom c-Reduktase.

Die Plasmamembranen aggregationskompetenter *D.discoideum* Zellen sammeln sich also vorwiegend auf der 1,17/1,32 M Saccharosestufe (Fraktion 6), was aus der Anreicherung des Plasmamembranmarkers alkalische Phosphatase in diesen Membranen hervorgeht. Die Mitochondrien, charakterisiert durch Succinatdehydrogenase, befinden sich zum größten Teil in der Fraktion, die die 1,32/1,45 M Saccharosestufe enthält. Die Lysosomen mit α -Mannosidase als Leitenzym verteilen sich über mehrere Fraktionen. Die Unzuverlässigkeit der NADPH Cytochrom c-Reduktase als ER-Marker wurde schon auf S.74 besprochen.

In der die Plasmamembranen enthaltenden Fraktion 6 wurde der größte Teil des 80 kDa Glykoproteins nachgewiesen (Fig.28A;Fraktion 6). Um die Verteilung der 66 kDa und 53 kDa CSA-Formen in den subzellulären Fraktionen zu bestimmen, wurde ein Homogenat (H) Tunicamycin-behandelter Wildtypzellen in eine 10 000xg Pelletfraktion (P10) und eine 10 000xg Überstandsfraktion (S10) aufgetrennt. Beide Fraktionen wurden durch Zentrifugation im diskontinuierlichen Saccharosegradienten separat weiter fraktioniert. Während das 66 kDa Glykoprotein nahezu vollständig in der 10 000xg Pelletfraktion und nur in Spuren in der 10 000xg Überstandsfraktion wiedergefunden wurde, war das 53 kDa Tunicamycinprodukt auf beide Fraktionen etwa gleichmäßig verteilt (Fig.28B). Das 66 kDa Glykoprotein war, wie das 80 kDa Glykoprotein, in Membranen angereichert, die sich auf der 1,17/1,32 M Saccharosestufe sammelten (Fig.28B;Fraktion 6). Der geringe Anteil, der in der 10 000xg Überstandsfrak-

tion verblieben war, befand sich hauptsächlich in Membranen der 1,02/1,17M Saccharosefraktion (Fig.28C;Fraktion 5).

Das 53 kDa Protein der 10 000xg Pelletfraktion war zwischen den Fraktionen, die von 1,02 bis 1,45 M Saccharose reichten und der Fraktion am Boden des Saccharosegradienten gleichmäßig verteilt (Fig.28B;Fraktion 5-8). Das 53 kDa Protein der 10 000xg Überstandsfraktion war ebenfalls über diese Fraktionen verteilt (Fig.28C;Fraktion 5-8). Es war aber etwas in der schwersten Fraktion angereichert. Nicht anders verteilte sich das 53 kDa Protein (Fig.28D;Fraktion 5-8), wenn ein Homogenat von Tunicamycin-behandelten Zellen fraktioniert wurde, die dieses Protein als einzige CSA-Form produzierten (siehe Fig.12).

Während die 80 kDa CSA-Form aus der 100 000xg Pelletfraktion in der Fraktion 4 des Saccharosegradienten angereichert ist, in der auch die höchste Sulfatierungskapazität gefunden wird, befindet sich der Hauptteil des Glykoproteins aus der 10 000xg Pelletfraktion in der Fraktion 6, in der auch die alkalische Phosphatase angereichert ist. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß durch die differentielle Zentrifugation 80 kDa CSA-Moleküle aus Golgi- und Plasmamembranen voneinander getrennt wurden (vergleiche Fig.20).

Die Anreicherung der 80 kDa und 66 kDa Formen in der Fraktion 6 des Saccharosegradienten weist darauf hin, daß die nur durch Typ2 Kohlenhydrat modifizierte 66 kDa Form wie das vollständig glykosylierte 80 kDa Protein in die

Plasmamembran transportiert wird. Die Verteilung der 53 kDa Form auf verschiedene Fraktionen zeigt, daß die unglykosylierte CSA-Form nicht gezielt zur Plasmamembran gelangt.

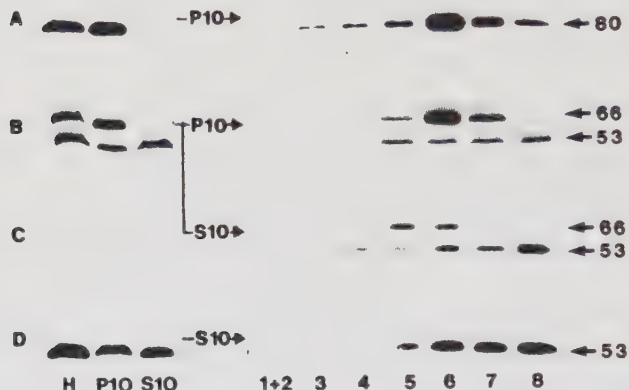


Fig.28 Verteilung der verschiedenen CSA-Formen aus unbehandelten und Tunicamycin-behandelten Wildtypzellen in Fraktionen, die durch diskontinuierliche Saccharosegradientenzentrifugation einer 10 000xg Pelletfraktion oder einer 10 000xg Überstandsfraktion erhalten wurden

Unbehandelte Wildtypzellen (A) oder Wildtypzellen, die 1 Stunde nach Beginn (B,C) oder schon 4 Stunden vor Beginn (D) der Entwicklung mit Tunicamycin behandelt worden waren, wurden nach 6 Stunden (A,B,C) oder 14 Stunden (D) Entwicklungszeit geerntet und lysiert. Aus den Homogenaten (H) wurde eine 10 000xg Pelletfraktion (P10) und eine 10 000xg Überstandsfraktion (S10) hergestellt und beide im diskontinuierlichen Saccharosegradienten separat aufgetrennt. Es wurde der in Fig.19 gezeigte Gradient verwendet. Die Fraktionen 1 und 2 der Fig.19 sind in einer Fraktion zusammengefaßt. Von Homogenaten, 10 000xg Pelletfraktionen und 10 000xg Überstandsfraktionen wurden Mengen, die 3×10^6 Zellen entsprachen, von den Gradientenfraktionen jeweils 0,4 % der Gesamtfraktion durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrocellulose transferiert, mit $^{125}\text{J-mAk}$ 33-294-17 markiert und autoradiographiert. Die Positionen der 80 kDa und 66 kDa Glykoproteine und des 53 kDa Proteins sind rechts angegeben.

Die Verteilung der verschiedenen CSA-Formen zwischen Zellinnerem und Zelloberfläche in unbehandelten und in Tunicamycin-behandelten Wildtyp-Zellen

Die CSA-Formen auf der Zelloberfläche können durch ihre Zugänglichkeit für den Protein-spezifischen anti-CSA mAk 41-71-21 in intakten Zellen von denen im Zellinneren unterschieden werden. Die Zellen wurden mit dem Antikörper inkubiert und der nicht gebundene Anteil durch Waschen der Zellen entfernt. Die gebildeten Immunkomplexe wurden nach Lyse der Zellen präzipitiert und durch Immunoblotten analysiert. Etwa 80% des gesamten immunpräzipitierbaren 80 kDa Glykoproteins aus aggregationskompetenten Wildtyp-Zellen wurde auf diese Weise isoliert, während die 68 kDa CSA-Vorstufe unter diesen Bedingungen nicht präzipitiert wurde (Fig.29;1,2 und Tab.5). Die Zuverlässigkeit der Methode wurde bestimmt, indem ein Aliquot eines Detergenzextraktes von Tunicamycin-behandelten Zellen, der nur die 53 kDa CSA-Form enthielt, am Beginn der Lyse der Zellen zugefügt wurde. Von diesem Protein wurde nur 10% im Immunpräzipitat gefunden. Die Präzipitation des 80 kDa Glykoproteins war nicht beeinträchtigt (Fig.29;3,4 und Tab.5). Die hier verwendete Methode ist also geeignet, CSA-Formen auf der Zelloberfläche von denen im Zellinnern zu unterscheiden. Die Ergebnisse bestätigen die Lokalisation der Hauptmenge des 80 kDa Glykoproteins auf der Zelloberfläche. Auch zeigt dieses Experiment, daß die 68 kDa Vorstufe,

die nicht in der mit Plasmamembranen angereicherten 10 000xg Pelletfraktion gefunden wurde (siehe Fig.18), nur im Zellinneren vorhanden ist.

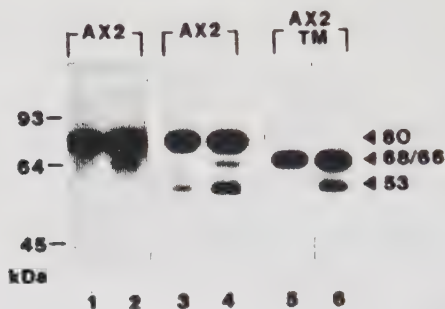


Fig.29 Expression der unterschiedlich glykosylierten CSA-Formen auf der Zelloberfläche des Wildtyps

AX2 Wildtypzellen, die sich ohne Tunicamycin (1-4) und in dessen Anwesenheit (5,6) entwickelt hatten, wurden mit mAk 41-71-21 inkubiert. Nach Entfernen des ungebundenen Antikörpers wurden die Zellen durch Zugabe von DTT-Hepes Puffer-1% (v/v) Octyloligooxyäthylen lysiert und die gebildeten Immunkomplexe präzipitiert (1,3,5). Ein gleicher Anteil der Zellen wurde erst lysiert, dann wurde mit mAk 41-71-21 inkubiert und die Immunpräzipitation vorgenommen (2,4,6). Als Test auf die Spezifität der Präzipitation von Zelloberflächenproteinen wurde ein Aliquot der unbehandelten Wildtypzellen durch DTT-Hepes Puffer-1% (v/v) Octyloligooxyäthylen lysiert, dem ein Octyloligooxyäthylenextrakt einer Membranfraktion von Tunicamycin-behandelten Zellen beigemischt worden war, die nur die 53 kDa CSA-Form gebildet hatten (3,4). Die Immunpräzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert, mit ^{125}J -mAk 33-294-17 markiert und autoradiographiert. Die Immunpräzipitate entstammen pro Spur 5×10^6 unbehandelten oder 1×10^7 Tunicamycin-behandelten Wildtypzellen. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen der 80 kDa, 68 kDa, 66 kDa Glykoproteine und des 53 kDa Proteins sind rechts angegeben.

In Tunicamycin-behandelten Wildtypzellen wurden etwa 70% des vorhandenen 66 kDa Glykoproteins auf der Zelloberfläche nachgewiesen, aber nur Spuren des 53 kDa Proteins (Fig.29;5,6 und Tab.5). Die vollständige Hemmung der Glykosylierung der CSA verhindert also den Transport zur Zelloberfläche. Dies ist eine Folge der fehlenden Glykosylierung und beruht nicht auf einem indirekten Effekt des Tunicamycins. Dies beweist der praktisch ungehinderte Transport der teilglykosylierten 66 kDa CSA-Form, die zusammen mit dem 53 kDa Protein von den gleichen Zellen gebildet wird. Die Expression des 66 kDa Glykoproteins auf der Zelloberfläche zeigt, daß zum Transport dorthin Typl Kohlenhydrat nicht notwendig ist und bestätigt damit die Ergebnisse der Membranfraktionierung im Saccharosegradienten.

	CSA-Form	gebundener $^{125}\text{J-mAk}$	
		intakte Zellen cpm	Zellextrakt cpm
AX2	80 kDa	810 (79%)	1027
AX2	68 kDa	11 (1%)	82
AX2, tunicamycinb.	66 kDa	595 (69%)	866
AX2, tunicamycinb.	53 kDa	14 (1%)	353
HG220	68 kDa	168 (20%)	922
HG220, tunicamycinb.	53 kDa	36 (9%)	394
HG592	80 kDa	3012 (62%)	4829
HG592	68 kDa	24 (6%)	394
HG701	68 kDa	793 (36%)	2222
HG701, tunicamycinb.	53 kDa	168 (11%)	1530
Kontrolle		24 (10%)	243

Tab.5 Expression der verschiedenen CSA-Formen auf der Zelloberfläche

Aus den Filtern, die in den Figuren 29 und 35 benutzt wurden, wurden die Banden der verschiedenen CSA-Formen ausgeschnitten und der gebundene $^{125}\text{J-mAk}$ im γ -Zähler bestimmt.

Ein zusätzlicher Hinweis darauf, daß die teilglykosylierte 66 kDa Form, aber nicht die unglykosylierte 53 kDa CSA-Form, auf die Zelloberfläche gelangt, lieferte die Untersuchung des Mediums, in dem sich Tunicamycin-behandelte Zellen entwickelt hatten. Die Zugabe des Glykosylierungsinhibitors zwei Stunden nach Induktion der Entwicklung zu den Zellen führte zur Synthese der nicht glykosylierten 53 kDa Form, der nur mit Typ2 Kohlenhydrat modifizierten 66 kDa Form und einer geringen Menge an vollständig glykosylierter 80 kDa Form (Fig.30A). Von den glykosylierten und teilglykosylierten Formen wurden in den folgenden 8 Stunden Spuren im Medium nachgewiesen, während der Hauptteil in den Zellen verblieb. 22 Stunden nach Induktion der Entwicklung war die Verteilung umgekehrt. Der größte Teil der 80 kDa und 66 kDa Glykoproteine wurde im Medium gefunden. Dieser Befund deutet darauf hin, daß diese CSA-Formen nach einer gewissen Verweildauer auf der Zelloberfläche von dort schließlich in das Medium abgegeben werden.

Da das 53 kDa Protein nicht zur Zelloberfläche transportiert wird (siehe Fig.29), könnte es nur auf einem anderen Weg, etwa über Lysosomen, in das Medium gelangen. Die experimentellen Befunde zeigen, daß dies beim Wildtyp nicht geschieht (Fig.30B). Die unglykosylierte CSA-Form wurde in den ersten 10 Stunden nach Induktion der Entwicklung nicht und 22 Stunden danach nur in Spuren im Medium gefunden. Ähnlich war die Verteilung des Proteins

zwischen Zellen und Medium, wenn die Tunicamycinbedingungen so gewählt waren, daß das 53 kDa Protein als einzige CSA-Form gebildet wurde (siehe Fig.12).

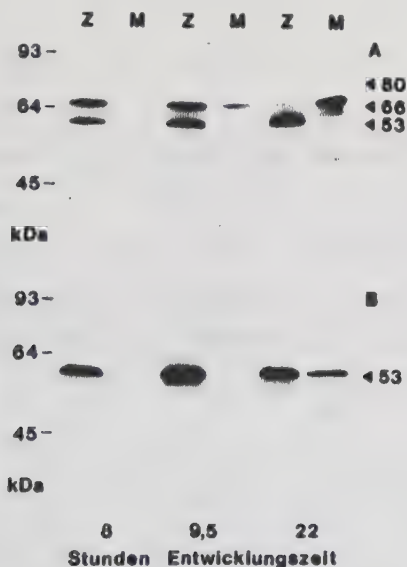


Fig.30 Das 66 kDa Glykoprotein, aber nicht das unglykosylierte 53 kDa Protein Tunicamycin-behandelter Zellen wird nach der Akkumulation auf der Zelloberfläche in das Medium abgegeben

Zellen des Wildtyps entwickelten sich in Gegenwart von 0,4 µg/ml Tunicamycin, das eine Stunde nach Induktion der Entwicklung zugesetzt worden war (A). In einer zweiten Zellsuspension war der Inhibitor 4 Stunden vor der Entwicklung und von deren Beginn an vorhanden (B). Zu verschiedenen Zeiten wurden 0,1 ml Zellsuspension (1x10⁷ Zellen/ml) zentrifugiert, das in 0,1 ml Phosphatpuffer resuspendierte Zellpellet (Z) und der Überstand (M) mit 11 µl 10-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970) versetzt und gekocht. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert, mit ¹²⁵I-J-mAk 33-294-17 markiert und autoradiographiert. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen der 80 kDa, 66 kDa Glykoproteine und des 53 kDa Proteins sind rechts angegeben.

Der Transport der 68 kDa CSA-Form in den Mutanten HG220 und HG701

Die Mutante HG220 ist ein durch genetische Rekombination gewonnener axenisch wachsender Stamm, der die für die unvollständige Glykosylierung der CSA-Polypeptidkette verantwortliche Mutation der ursprünglichen HL220-Mutante trägt (E. Wallraff, unveröffentlichte Ergebnisse, siehe Tab.2). Die Mutante HG701 wurde aus einer mit MNNG mutagenisierten Population des Stammes HG592 (Gerisch et al., 1985b) selektioniert. Diese Mutante glykosyliert wie HG220 und HL220 die CSA nicht mit Typ2 Kohlenhydrat (M. Yoschida, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Menge an 68 kDa Glykoprotein, das in allen drei Mutantenstämmen die einzige CSA-Form darstellt, ist im Vergleich zum 80 kDa Glykoprotein des Wildtyps deutlich reduziert. Um zu klären, wie es zu der geringen Konzentration des Glykoproteins in diesen Mutanten kommt, wurde seine Beständigkeit in den Zellen bestimmt. Dies geschah durch Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid in Zellen, die sich 6 Stunden entwickelt und somit das 68 kDa Glykoprotein expremiert hatten. In den folgenden 3,5 bis 4 Stunden wurde die Menge der 68 kDa Form in den Zellen quantifiziert (Fig.31 und Fig.32). Das gleiche geschah in Zellsuspensionen, die nicht mit Cycloheximid versetzt waren. Als Vergleich diente die vollständig glykosylierte 80 kDa CSA-Form aus Zellen des Wildtyps bzw. der Mutante HG592 und die nur mit Typ2 Kohlenhydrat versehene 66 kDa CSA-Form, die

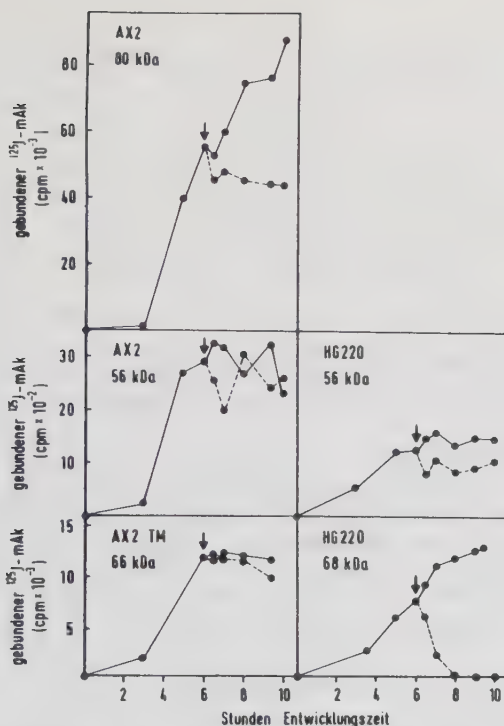


Fig.31 Abnahme der 80 kDa, 68 kDa und 66 kDa CSA-Formen in unbehandelten und Tunicamycin-behandelten Zellen des Wildtyps und der Mutante HG220 nach Inhibition der Neusynthese

Die Akkumulation der verschiedenen CSA-Formen (80 kDa, 68 kDa, 66 kDa) wurde in Wildtypzellen (AX2), Tunicamycin-behandelten Wildtypzellen (AX2 TM), in Zellen der Mutanten HG220 (HG220) und der Tunicamycin-behandelten Mutanten (HG220 TM) bestimmt. In den unbehandelten Zellen wurde außerdem die Akkumulation eines entwicklungsregulierten 56 kDa Membranproteins (56 kDa) bestimmt. Die Tunicamycinbehandlung begann 1 Stunde nach Induktion der Entwicklung. Nach 6 Stunden Entwicklungszeit (Pfeil) kam zu je einer Hälfte der Zellsuspensionen 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cycloheximid (gestrichelte Linie), die andere erhielt kein Cycloheximid (durchgezogene Linie). Zur Quantifizierung der Proteine wurden 2×10^6 Zellen enthaltende Proben genommen, aus denen eine Membranfraktion hergestellt wurde. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert, mit ^{125}J -mAk 33-294-17 markiert und autoradiographiert. Die entsprechenden Banden wurden aus dem Filter geschnitten und die gebundene Radioaktivität im γ -Zähler bestimmt.

von diesen beiden Stämmen in Gegenwart von Tunicamycin gebildet wird.

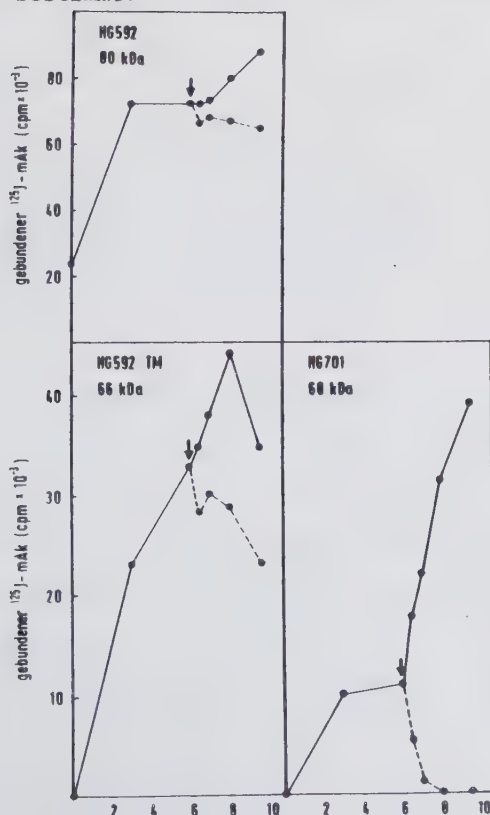
Im Wildtyp (AX2; Fig. 31, links) erwies sich das vollständig glykosylierte 80 kDa Protein als sehr stabil. 3,5 Stunden nach Inhibition der Neusynthese waren noch mehr als 80% von ihm vorhanden. Das gleiche gilt für das nur Typ2 Kohlenhydrat enthaltende 66 kDa Glykoprotein; nach 3,5 Stunden wurden noch 75% dieses Glykoproteins in den Tunicamycin-behandelten Wildtypzellen gefunden. Das nur mit Typ1 Kohlenhydrat versehene 68 kDa Produkt der Mutante HG220 (HG220; Fig. 31, rechts) verhielt sich ganz anders. Schon 2 Stunden nach Hemmung der Neusynthese war es in den Zellen nicht mehr nachweisbar. Sein Verschwinden läßt sich nicht mit einer allgemein erhöhten proteolytischen Aktivität in der Mutante HG220 erklären. Dies zeigt die Stabilität eines anderen, wahrscheinlich nicht glykosylierten entwicklungsregulierten Membranproteins. Dieses 56 kDa Protein wird durch den Antikörper 83-418-1 erkannt (siehe S. 37, Tab. 1). Es zeigte in der Mutante nur eine unwesentlich geringere Verweildauer als im Wildtyp.

Den gleichen Einfluß auf die Beständigkeit der verschiedenen CSA-Formen hatte die Glykosylierung in der Mutante HG701 (HG701; Fig. 32, rechts) und in deren Elternstamm HG592 (HG592; Fig. 32, links). Das 80 kDa Glykoprotein des Elternstammes war ebenso stabil, wie das infolge der Tunicamycin-Behandlung vom selben Stamm gebildete 66 kDa Glykoprotein. Das 68 kDa Glykoprotein der Mutante HG701 war

2 Stunden nach Inhibition der Neusynthese nicht mehr in den Zellen vorhanden. Der rasche Verlust des nur durch Typ1 Kohlenhydrat modifizierten Proteins in zwei unabhängigen Mutanten legt nahe, daß das Fehlen von Typ2 Kohlenhydrat für die geringe Beständigkeit der zellulären 68 kDa Form verantwortlich ist.

Fig.32 Abnahme der 80 kDa, 68 kDa und 66 kDa CSA-Formen in unbehandelten und Tunicamycin-behandelten Zellen der Mutante HG701 und deren Elternstamm HG592 nach Inhibition der Neusynthese

Die Akkumulation der verschiedenen CSA-Formen (80 kDa, 68 kDa, 66 kDa) wurde in der Mutante HG701 (HG701), in der Tunicamycin-behandelten Mutante HG701 (HG701 TM), in dem Elternstamm HG592 (HG592) und im Tunicamycin-behandelten Elternstamm HG592 (HG592 TM) wie in der Legende zu Figur 30 beschrieben bestimmt.



Abbauprodukte der 68 kDa und 53 kDa Formen akkumulieren im Medium unbehandelter bzw. Tunicamycin-behandelter Zellen der Mutante HG220

Die rasche Abnahme des Gehaltes an 68 kDa Glykoprotein in den Mutanten HG220 und HG701 nach Inhibition der Neusynthese könnte dadurch hervorgerufen werden, daß diese CSA-Form intrazellulär einer erhöhten proteolytischen Degradation unterliegt - eine Folge unvollständiger Glykosylierung, die auch bei anderen Proteinen beobachtet wurde (Olden et al., 1982; Olden et al., 1985). Andererseits könnte aber die 68 kDa Form auch durch Abgabe in das Medium aus den Zellen verschwinden. Dabei wären zwei Fälle zu unterscheiden: Abgabe des intakten 68 kDa Glykoproteins, z.B. wegen ungenügender Verankerung dieser Form in der Plasmamembran, oder rasche Degradation des an der Zelloberfläche exponierten Glykoproteins unter Freisetzung von Abbauprodukten in das Medium. Die Untersuchung des Mediums zeigte, daß schon 5 Stunden nach Induktion der Entwicklung Fragmente des 68 kDa Glykoproteins nachzuweisen waren, die hier im Verlauf der Entwicklung akkumulierten (Fig.33). Zwei dieser Fragmente bilden eine Doppelbande bei 50 kDa, ein drittes Fragment besitzt ein apparentes Molekulargewicht von 42 kDa. Auch nach verlängerter Expositionszeit der Autoradiogramme wurden keine Spuren des intakten 68 kDa Glykoproteins im Medium gefunden, während die Fragmente in den Zellen nicht nachweisbar waren. Die rasche Abnahme des Gehaltes an 68 kDa Glykoprotein in der Mutante HG220 nach Hemmung der Neusynthese läßt sich also zwanglos auf die schnelle

Degradation des zur Zelloberfläche transportierten Glykoproteins zurückführen.



Fig.33 Das 68 kDa Glykoprotein der Mutante HG220 akkumuliert in degradierter Form im Medium

Zu verschiedenen Zeiten nach Induktion der Entwicklung wurden 0,1 ml einer Suspension von Zellen der Mutante HG220 (1×10^7 Zellen/ml) zentrifugiert, das in 0,1 ml Phosphatpuffer resuspendierte Zellpellet (Z) und der Überstand (M) mit 11 μ l 10-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970) versetzt und gekocht. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert, mit $^{125}\text{J-mAk 33-294-17}$ markiert und autoradiographiert. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen des 68 kDa Glykoproteins und der 50 kDa und 42 kDa Abbauprodukte sind rechts angegeben.

Ein alternativer Weg für die Akkumulation proteolytischer Fragmente im Medium würde über die Lysosomen führen. In diese könnte das 68 kDa Glykoprotein infolge eines Transportdefektes der Mutante oder des Fehlens von Typ2 Kohlenhydrat gelangen. Hier würde es abgebaut und

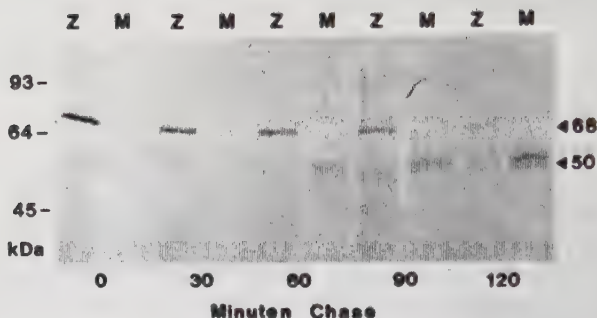


Fig.34 [^{35}S] Sulfat-Pulse/Chase-Markierung in Zellen der Mutante HG220 und anschließende Immunpräzipitation des 68 kDa Glykoproteins und seiner Abbauprodukte aus Zelllysat und Medium

Zellen der Mutante HG220 wurden 5 Stunden nach Induktion der Entwicklung für 5 Minuten mit 1 mCi/ml [^{35}S] Sulfat markiert. Die Zellen wurden zentrifugiert und in 1 mM Natriumsulfat enthaltendem Medium, in dem sich Mutantenzellen 5 Stunden entwickelt hatten, zum Ausgangsvolumen resuspendiert. 0,9 ml Proben mit 9×10^6 Zellen wurden unmittelbar nach dem Pulse und nach verschieden langem Chase entnommen, zentrifugiert und das 68 kDa Glykoprotein und seine Abbauprodukte aus dem Zelllysate (Z) und dem Medium (M) immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und fluorographiert. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen des 68 kDa Glykoproteins und der Fragmente bei 50 kDa sind rechts angegeben.

in proteolytisch degradiert Form in das Medium sezerniert. Obwohl bereits das Fehlen von intrazellulären Abbauprodukten dagegen sprach, wurde der Weg über die Lysosomen durch Pulse/Chase-Markierung der 68 kDa CSA-Form ausgeschlossen. Unmittelbar nach dem radioaktiven Pulse war nur das 68 kDa Glykoprotein markiert. Nach 30 Minuten erschienen die beiden 50 kDa Fragmente im Medium, ohne daß sie vorher in den Zellen nachzuweisen waren. In den Zellen wurde nur das

Pulse-markierte 68 kDa Glykoprotein gefunden. Es war nach zwei Stunden Chase-Zeit vollständig in das Medium abgegeben und abgebaut worden. Die Pulse-Markierung wurde mit [35 S]Sulfat durchgeführt. Sie erlaubte den Nachweis, daß die beiden 50 kDa Fragmente sulfatiert sind und somit Typl Kohlenhydrat besitzen. Das 42 kDa Fragment stellt dagegen ein nicht sulfatiertes Spaltprodukt dar.

Durch Immunmarkierung intakter Zellen mit mAk 41-71-21 konnte die 68 kDa Form der Mutanten HG220 und HG701 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Fig.35). Dieses Experiment wurde in gleicher Weise wie der Nachweis der 80 kDa und 66 kDa Formen auf der Oberfläche der Wildtypzellen durchgeführt. 20% des gesamten in den Zellen der Mutante HG220 vorhandenen 68 kDa Glykoproteins wurde durch Antikörper präzipitiert, die an die Oberfläche intakter Zellen gebunden waren (Fig.35;1,2 und Tab.5). In der Mutante HG701, in der im Vergleich zu HG220 etwa das dreifache an 68 kDa Glykoprotein pro Zelle gefunden wird (M. Yoshida, unveröffentlichte Ergebnisse), betrug der Anteil, der sich auf die gleiche Weise präzipitieren ließ, 36% (Fig.35;3,4 und Tab.5). Im Elternstamm dieser Mutante, der Mutante HG592, wird das 80 kDa CSA-Glykoprotein zu 62% nach Antikörperbindung an die Zelloberfläche präzipitiert, die 68 kDa Vorstufe nur zu 6% (Fig.35;5,6 und Tab.5).

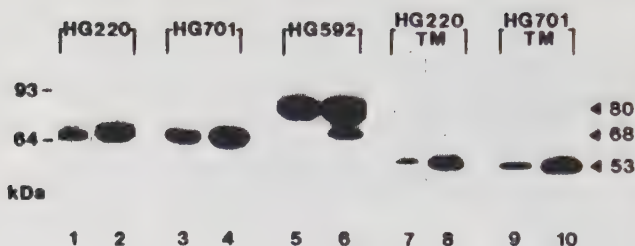


Fig.35 Expression der unterschiedlich glykosylierten CSA-Formen auf der Zelloberfläche der Mutanten HG220, HG701 und HG592

Zellen der Mutanten HG220, HG701 und HG592, die sich ohne Tunicamycin (1-6) und in dessen Anwesenheit (7-10) entwickelt hatten, wurden mit mAk 41-71-21 inkubiert. Nach Entfernen des nicht gebundenen Antiköpers wurden die Zellen durch DTT-Hepes Puffer-1% (v/v) Octyloligooxyäthylen lysiert und die Immunkomplexe präzipitiert (1,3,5,7,9). Ein Teil der Zellen wurde erst lysiert, das Lysat mit dem Antikörper inkubiert und die Immunkomplexe präzipitiert (2,4,6,8,10). Die präzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert, mit ^{125}J -mAk 33-294-17 inkubiert und autoradiographiert. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen der 80 kDa und 68 kDa Glykoproteine und des 53 kDa Proteins sind rechts angegeben.

Der Nachweis des 68 kDa Glykoproteins auf der Oberfläche der Mutantenzellen und von degradierten Formen ausschließlich im Medium, zeigt, daß die 68 kDa CSA-Form auf die Oberfläche der Mutante HG220 gelangt. Im Gegensatz zum 80 kDa Glykoprotein aus Wildtypzellen und zum 66 kDa Glykoprotein aus Tunicamycin-behandelten Zellen akkumuliert es hier jedoch nicht, sondern wird von im Medium oder auf der Zelloberfläche vorhandenen Proteasen abgelöst und in degradiert Form in das Medium abgegeben.

Hemmung der Glykosylierung der CSA mit Typ1 Kohlenhydrat durch Tunicamycin führt in den Mutanten HL220, HG220 und HG701, in denen die Glykosylierung mit Typ2 Kohlenhydrat unterbunden ist, zur Synthese des unglykosylierten 53 kDa Proteins als einziger CSA-Form. Der Anteil an 53 kDa Protein, der nach Inkubation intakter Tunicamycin-behandelter Zellen der Mutanten HG220 und HG701 mit mAk 41-71-21 präzipitiert wurde, betrug 9% und 11% des gesamten aus den Zelllysaten durch Immunpräzipitation isolierbaren 53 kDa Proteins (Fig.35;7-10 und Tab.5). Dieser Anteil war nicht höher als der, der im Immunpräzipitat vorhanden war, wenn das Antigen erst nach der Antikörperinkubation, zu Beginn der Lyse den Zellen zugefügt wurde (siehe Fig.29;3,4 und Tab.5). Das 53 kDa Protein war also in den Mutanten ebensowenig wie im Wildtyp auf der Zelloberfläche nachzuweisen. Überraschend war deshalb, daß in Tunicamycin-behandelten Kulturen der Mutante HG220 Fragmente des 53 kDa Proteins im Medium auftraten (Fig.36). Es wurde ein Paar von Polypeptiden bei 53/51 kDa und ein zweites wesentlich stärker Antikörper-markiertes Paar bei 47/45 kDa gefunden. In den Zellen konnten diese Degradationsprodukte nicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlich gelangt also das unglykosylierte Protein auf die Oberfläche der Mutantenzellen. Hier reichert es sich noch weniger als die 68 kDa CSA-Form an, sondern wird als Ganzes oder in Form proteolytischer Abbauprodukte in das Medium abgegeben.



Fig.36 Das unglykosylierte 53 kDa Protein der Tunicamycin-behandelten Mutante HG220 akkumuliert in degradierter Form im Medium

Zu verschiedenen Zeiten nach Induktion der Entwicklung wurden 0,1 ml einer Suspension von Zellen der Tunicamycin-behandelten Mutante HG220 (1×10^7 Zellen/ml) zentrifugiert, das in 0,1 ml Phosphatpuffer resuspendierte Zellpellet (Z) und der Überstand (M) mit $11 \mu\text{l}$ 10-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970) versetzt und gekocht. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert, mit ^{125}J -mAk 33-294-17 markiert und autoradiographiert. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen des 53 kDa Proteins und der 47 kDa und der 45 kDa Abbauprodukte sind rechts angegeben.

DISKUSSION

DIE GLYKOSYLIERUNG DER CSA-POLYPEPTIDKETTE MIT 2 UNTERSCHIEDLICHEN KOHLENHYDRATTYPEN

Tab.6 gibt einen Überblick über die verschiedenen CSA-Formen, die durch unvollständige oder fehlende Glykosylierung der Polypeptidkette entstehen. Das CSA-Glykoprotein aus aggregationskompetenten Wildtypzellen von *D.discoideum* besitzt ein apparentes Molekulargewicht von 80 kDa. In wesentlich geringerer Menge liegt in diesen Zellen auch eine 68 kDa CSA-Form vor (Fig.4). Unter dem Einfluß des N-Glykosylierungsinhibitors Tunicamycin werden Formen mit apparenten Molekulargewichten von 66 kDa und 53 kDa gebildet (Ochiai et al., 1982b). Als einziges CSA-Produkt wird in einer Reihe von Glykosylierungs-defekten Mutanten (HL220, HG220, HG701) ein Protein bei 68 kDa nachgewiesen (Gerisch et al., 1985a; E. Wallraff, unveröffentlichte Ergebnisse; M. Yoshida, unveröffentlichte Ergebnisse). Tunicamycinbehandlung dieser Mutanten führt zum 53 kDa Produkt (Bertholdt et al., 1985).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, wie es zu diesen CSA-Formen kommt und wodurch sie sich voneinander unterscheiden. Die Ergebnisse gewähren einen Einblick in die Stufen der posttranslationalen Modifizierung des CSA-Glykoproteins.

Durch Pulse/Chase-Markierung aggregationskompetenter Wildtypzellen mit [³⁵S]Methionin konnte gezeigt werden, daß

das 80 kDa Glykoprotein aus einer 68 kDa Vorstufe entsteht (Fig.5). Ebenfalls durch Pulse/Chase-Markierung wurde nachgewiesen, daß die 66 kDa Form Tunicamycin-behandelter Wildtypzellen aus einer 53 kDa Vorstufe gebildet wird (Fig.6). Die 80 kDa und 68 kDa Formen werden im Gegensatz zu den beiden Produkten Tunicamycin-behandelter Zellen von ConA markiert (Fig.11).

80 kDa csa-Form:	Endprodukt in Wildtypzellen
68 kDa csa-Form:	in geringer Menge in Wildtypzellen vorhandene Vorstufe
	einziges Produkt in den Mutanten HL220, HG220 bzw. HG701
66 kDa csa-Form:	Hauptprodukt in Tunicamycin-behandelten Zellen, wenn der Inhibitor kurz vor Beginn der csa-Synthese zugesetzt wurde
53 kDa csa-Form:	Hauptprodukt in Tunicamycin-behandelten Zellen, wenn der Inhibitor schon in der Vermehrungsphase vorhanden war
	einziges Produkt der Tunicamycin-behandelten Mutanten

Tab.6 Überblick über die verschiedenen CSA-Formen, die durch unterschiedliche oder fehlende Glykosylierung der Polypeptidkette entstehen

Tunicamycin verhindert die Glykosylierung der am rauen ER entstehenden Polypeptidkette (Takatsuki et al., 1971a; Takatsuki und Tamura, 1971b) mit der Oligosaccharid-Vorstufe $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Gluc}_3$, die in höheren eukaryontischen Zellen allen N-glykosidisch gebundenen Zuckern als Ausgangsstruktur zu Grunde liegt (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Ivatt und

Mitarbeiter (1984) zitieren eigene unveröffentlichte Ergebnisse, die zeigen, daß in *D. discoideum* ein lipidgebundenes Oligosaccharid vorliegt, das Mannose, Glukose und N-Acetylglukosamin enthält. Wurde durch milde alkalische Hydrolyse das Lipid abgespalten, coeluierte das freigesetzte Oligosaccharid aus einer kalibrierten Gelfiltrationssäule mit der Oligosaccharid-Vorstufe von Säugern. Die lipidgebundene Oligosaccharid-Vorstufe aus *D. discoideum* könnte also mit der aus höheren Eukaryonten identisch sein.

Die Hemmung der cotranslational erfolgenden Glykosylierung ist die Ursache dafür, daß in Tunicamycin-behandelten Zellen von *D. discoideum* die 53 kDa anstelle der 68 kDa CSA-Vorstufe gebildet wird. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß die 68 kDa Vorstufe durch Behandlung mit Endoglykosidase F in das 53 kDa Protein übergeführt werden kann (Fig.8). Diese Glykosidase entfernt N-glykosidisch gebundene Zuckerketten von Proteinen, indem sie die Bindung zwischen den beiden basalen N-Acetylglukosaminresten spaltet (Elder und Alexander, 1982). Es wurde berichtet, daß die kommerziell erhältlichen Endoglykosidase F-Präparate sowohl Endoglykosidase F als auch N-Glykanase Aktivitäten enthalten (Plummer et al., 1984). Die letztere Aktivität kann N-glykosidisch gebundene Zuckerketten vollständig vom Protein entfernen, indem sie die Asparagin-N-Acetylglukosamin-Bindung spaltet. Von Endoglykosidase H-Präparaten ist eine solche N-Glykanase Aktivität nicht bekannt. Möglicherweise erklärt dies, weshalb das Hauptprodukt der

Endoglykosidase H-Behandlung, an welches noch der innere der beiden basalen N-Acetylglukosaminreste gebunden ist, ein etwas höheres apparentes Molekulargewicht besitzt als das Produkt, das durch Behandlung mit der N-Glycanase-Aktivität enthaltenden Endoglykosidase F Präparat entsteht.

Proteine können durch Kohlenhydrate modifiziert werden, indem diese N-glykosidisch an einen Asparaginrest oder O-glykosidisch an Serin- oder Threoninreste gebunden werden. Im Gegensatz zur N-Glykosylierung, die cotranslational im rauhen ER stattfindet, erfolgt die O-Glykosylierung erst im Golgiapparat (Hannover und Lennarz, 1981). Da die 68 kDa CSA-Vorstufe zum größten Teil im rauhen ER nachgewiesen wurde (Fig.19), kann sie nach diesem Ergebnis noch nicht mit O-glykosidisch gebundenen Zuckern modifiziert sein. Das 53 kDa Protein, das aus dieser Vorstufe durch Abspaltung der N-glykosidisch gebundenen Zucker mittels Endoglykosidasen entsteht, stellt also die unglykosylierte CSA-Form dar. Dies wird dadurch bestätigt, daß aus der Aminosäuresequenz 51,5 kDa als Molekulargewicht der CSA-Polypeptidkette berechnet wurde (Noegel et al., 1986).

Mit dem Übergang von der 68 kDa Vorstufe zum 80 kDa Glykoprotein erhalten die CSA Bindestellen für WGA und die Kohlenhydrat-spezifischen anti-CSA mAk's 40-178-3 und 12-120-94. Diese Epitope können nicht durch Modifizierung der bereits auf der Vorstufe vorhandenen Kohlenhydratketten entstanden sein, denn auch die 66 kDa Form, die aus der unglykosylierten 53 kDa Vorstufe in Tunicamycin-behandelten

Zellen gebildet wird, bindet an das Lektin und die Antikörper (Fig.6 und Fig.7). Es muß also angenommen werden, daß die CSA durch einen zweiten, vom ersten unabhängigen Glykosylierungsschritt modifiziert werden, der auch in Anwesenheit von Tunicamycin möglich ist.

Das 68 kDa Glykoprotein ist die einzige CSA-Form, die in den Mutanten HL220, HG220 und HG701 nachgewiesen werden kann. In diesen Zellen ist also der zweite Glykosylierungsschritt unterbunden. Auch durch längere Vorbehandlung der Wildtypzellen mit Tunicamycin kann neben dem ersten auch der zweite Glykosylierungsschritt verhindert werden. Die Folge ist eine Akkumulation des unglykosylierten 53 kDa Proteins (Fig.12).

Polypeptidkette + (Typ1 + Typ2) Kohlenhydrat = 80 kDa Form		
Polypeptidkette +	Typ1 Kohlenhydrat =	68 kDa Form
Polypeptidkette +	Typ2 Kohlenhydrat =	66 kDa Form
Polypeptidkette		= 53 kDa Form

Tab.7 Aufbau der verschiedenen CSA-Formen aus den drei Strukturelementen Polypeptidkette, Typ1 Kohlenhydrat und Typ2 Kohlenhydrat

Die im ersten Glykosylierungsschritt übertragenen Kohlenhydrate werden Typ1, die im zweiten Glykosylierungsschritt übertragenen Kohlenhydrate Typ2 genannt. In Tabelle 7 ist zusammengefaßt, wie sich die verschiedenen CSA-Formen aus den drei Strukturelementen Polypeptidkette, Typ1 Kohlenhydrat und Typ2 Kohlenhydrat zusammensetzen.

Der Beitrag von Typ1 Kohlenhydrat zum apparenten Molekulargewicht beträgt 14-15 kDa. Dies ergibt sich zum einen aus der Differenz zwischen den 80 kDa und 66 kDa CSA-Formen, zum anderen aus der Abnahme des apparenten Molekulargewichtes der 68 kDa CSA-Vorstufe um 15 kDa nach Abspaltung von Typ1 Kohlenhydrat durch Endoglykosidase F. Für Typ2 Kohlenhydrat ergibt sich aus der Differenz zwischen den 53 kDa und 66 kDa Formen, bzw. zwischen den 68 kDa und 80 kDa Formen ein Beitrag zum apparenten Molekulargewicht von 12-13 kDa. Hiermit stimmt überein, daß ein entwicklungs-reguliertes Glykoprotein aus *D.discoideum*, das nicht mit den CSA identisch ist, im Wildtyp ein Molekulargewicht von 80 kDa besitzt und in einer Mutante, die den gleichen Glykosylierungsdefekt aufweist wie HL220, bei 66 kDa nachgewiesen wird (West und Loomis, 1985). In diesem Glykoprotein leistet also Typ2 Kohlenhydrat praktisch wie im CSA-Glykoprotein einen Beitrag von 14 kDa zum apparenten Molekulargewicht.

Die Übertragung der Kohlenhydrate vom Typ1 auf die CSA-Polypeptidkette erfolgt cotranslational im rauhen ER. Dies ergibt sich daraus, daß nicht die 53 kDa CSA-Form,

sondern die bereits glykosylierte 68 kDa Vorstufe des CSA-Glykoproteins als erstes Produkt im Pulse/Chase-Experiment detektiert wird und diese Vorstufe in einer Membranfraktion des rauhen ER angereichert ist. Aus der Existenz der 68 kDa CSA-Vorstufe folgt, daß die Übertragung der Typ2 Kohlenhydrate ein posttranslationaler Prozeß sein muß.

Die Übertragung von Typ2 Kohlenhydrat findet im gleichen Kompartiment wie die Sulfatierung der CSA statt. Dies geht aus folgender Überlegung hervor: Der größte Teil der in den Zellen vorhandenen CSA-Moleküle nimmt an der zellfreien Sulfatierung nicht teil (Fig.19; Fig.25; Fig.26). Dies dürfte daran liegen, daß es sich um eine Reaktion handelt, die nur in Vesikeln stattfindet, in denen alle für die Sulfatierung notwendigen Komponenten, PAPS-Translokase, Sulfotransferase und Akzeptorglykoproteine vorhanden sind und daß sich zu einem gegebenen Zeitpunkt ein kleiner Anteil der 68 kDa Vorstufe in diesem Kompartiment befindet. Die andere mögliche Erklärung, daß nämlich der größte Teil der CSA über keine freien Sulfatakzeptorstellen verfügt, ist unwahrscheinlich, da auch nach der zellfreien Sulfatierung die CSA zum größten Teil in unsulfatierter Form oder in unvollständig sulfatierten Formen vorliegen (Fig.25).

Daß die CSA in ihrer 68 kDa Form bis zum Ort der Sulfatierung vordringen, zeigt auch die geringe Menge an sulfatierter 68 kDa Vorstufe, die in den Zellen gefunden wird. In höheren Eukaryonten ist der Golgiapparat der Ort der Protein- und Kohlenhydratsulfatierung (Fahrquahr und

Palade, 1981). Wurden aggregationskompetente Zellen von *D.discoideum* mit [³⁵S]Sulfat Pulse-markiert zeigte die elektronenmikroskopische Autoradiographie Schwärzung von Vesikeln, die mit denen des Golgiapparates koinzidierten, während Membranen des rauen ER nicht markiert waren (H.Schwarz, unveröffentlichte Ergebnisse). Membranen, die endogene Sulfatierungskapazität enthalten, besitzen eine für den Golgiapparat typische Dichte (Fig.19). Diese beiden Befunde sprechen dafür, daß auch in *D.discoideum* die Sulfatierung der Proteine und Kohlenhydrate im Golgiapparat erfolgt. Damit ist gleichzeitig das Kompartiment der Glykosylierung der CSA mit Typ2 Kohlenhydrat festgelegt, da im zellfreien System sowohl die 68 kDa Vorstufe als auch das 80 kDa Glykoprotein sulfatiert wird.

Während die Art der Bindung der Typ1 Kohlenhydrate an die Polypeptidkette durch ihre Sensitivität gegen Endoglykosidasen, die N-glykosidisch gebundene Kohlenhydrate abspalten, gesichert ist (Fig.8), muß die Frage nach der Bindung der Typ2 Kohlenhydrate offen bleiben. Die Inhibition dieses Glykosylierungsschrittes durch Tunicamycin ist ein Indiz für eine N-glykosidische Bindung. Tunicamycin verhindert die Neubildung von Oligosaccharid-Vorstufen aus aktivierten Monosacchariden indem es an Dolicholphosphat bindet, so daß dieses Lipid als Carrier der Oligosaccharid-Vorstufen nicht mehr zur Verfügung steht. Die Übertragung der zum Zeitpunkt der Inhibitorzugabe in den Zellen vorhandenen Oligosaccharid-Vorstufen auf die Proteine sollte demnach noch möglich sein. Die Glykosylierung der CSA mit Typ2

Kohlenhydrat wird erst einige Stunden nach Zugabe von Tunicamycin vollständig inhibiert. Dies könnte bedeuten, daß in den Zellen eine langlebige oder in großer Menge vorliegende Dolicholphosphatgebundene Vorstufe von Typ2 Kohlenhydrat vorhanden ist. Solange diese nicht aufgebraucht ist, erfolgt eine Modifikation der CSA mit Typ2 Kohlenhydrat auch in Anwesenheit von Tunicamycin. Der Nachweis einer solchen Vorstufe wäre nicht nur interessant, weil dadurch die Art der Bindung der Typ2 Kohlenhydrate geklärt würde, sondern auch, weil seine Eigenschaften, wie Übertragung auf die CSA-Polypeptidkette im Golgiapparat, seine hohe Konzentration in der Zelle bzw. seine lange Lebensdauer, von den lipidgebundenen Oligosaccharid-Vorstufen anderer eukaryontischer Zellen stark abweichen würde.

Die bei der Umwandlung der 68 kDa Vorstufe in das 80 kDa Glykoprotein übertragenen Epitope für WGA und die für Typ2 Kohlenhydrat-spezifischen anti-CSA Antikörper entstehen nicht aus den bereits auf der Vorstufe vorhandenen Typ1 Kohlenhydraten (siehe oben). Doch werden letztere mit der Reifung des Glykoproteins modifiziert. Dazu gehört die Sulfatierung, die zur isoelektrischen Heterogenität des Glykoproteins führt (siehe Anhang, Fig.56).

Die Modifikation der Typ1 Kohlenhydrate führt weiterhin zu einer Verringerung der Bindungskapazität für ConA. Dies äußert sich darin, daß die 80 kDa Form verhältnismäßig schwächer von ¹²⁵J-ConA markiert wird als die 68 kDa Vorstufe. Dies könnte auf eine Abnahme des Gehalt an Mannose

und damit auf eine Prozessierung vom "high mannose type" zum "complex type" Kohlenhydrat hinweisen.

Diese beiden Formen N-glykosidisch gebundener Kohlenhydrate können durch ihre unterschiedliche Sensitivität gegen die Endoglykosidasen H und F unterschieden werden. Endoglykosidase H spaltet nur "high mannose type" Kohlenhydrate von Proteinen ab, während Endoglykosidase F "high mannose type" und "complex type" Kohlenhydrate abspalten kann (Elder und Alexander, 1982). Sind jedoch die Kohlenhydrate resistent gegen beide Endoglykosidasen, wie dies in der 80 kDa Form der CSA der Fall ist, entfällt dieses Unterscheidungskriterium.

Für die lysosomalen Enzyme aus *D. discoideum* wurde die Modifizierung der basalen N-Acetylglukosaminreste durch Sulfat (Freeze und Hudson, 1983) oder Fukose (Ivatt et al., 1981) für die Resistenz N-glykosidisch gebundener Kohlenhydrate gegen Endoglykosidasen verantwortlich gemacht. Für die Typl Kohlenhydrate der CSA konnte die Sulfatierung als Ursache dieser Resistenz ausgeschlossen werden (Anhang, Fig.57). Die Fukosylierung erfolgt in den frühen Entwicklungsstadien von *D. discoideum* hauptsächlich an einem der beiden basalen N-Acetylglukosaminreste (Ivatt et al., 1984). Da in den CSA Fukose nachgewiesen wurde (Müller et al., 1979), könnte die Modifizierung mit diesem Zucker die CSA gegen Endoglykosidasen resistent machen.

Gegen das CSA-Glykoprotein wurden in verschiedenen Laboratorien monoklonale Antikörper hergestellt (Ochiai et

al., 1982a; Ochiai et al., 1982b; Murray et al., 1983; Siu et al., 1985). Man erhielt hauptsächlich solche Antikörper, die auch die 66 kDa aber nicht die 53 kDa CSA-Form markierten, also gegen Typ2 Kohlenhydrat gerichtet waren. Nur wenige Antikörper erwiesen sich als Protein-spezifisch, indem sie die unglykosylierte 53 kDa CSA-Form erkannten. Bislang wurden jedoch nie Antikörper erhalten, die die 80 kDa, aber nicht die beiden Tunicamycinprodukte markierten, d.h. die gegen Typ1 Kohlenhydrat gerichtet sind. Antiseren von Kaninchen, die mit gereinigtem 80 kDa CSA-Glykoprotein immunisiert worden waren, markieren die 66 kDa sehr viel stärker als die 53 kDa CSA-Form (Hirano et al., 1985; M. Yoshida, unveröffentlichte Ergebnisse). Von den in den Antiseren enthaltenen Antikörpern waren also weit mehr gegen Typ2 Kohlenhydrat als gegen die Polypeptidkette gerichtet. Diese Befunde zeigen, daß Typ2 Kohlenhydrat ein hochimmunes Antigen ist, vielleicht weil seine Struktur stark von den in Vertebratenzellen vorkommenden Kohlenhydratstrukturen abweicht. Die Typ1 Kohlenhydrate lösten in den bisherigen Versuchen keine Immunantwort aus. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß sie eine auch in Vertebraten anzutreffende Struktur besitzen, gegen die eine Immuntoleranz besteht.

In allen bisher untersuchten Zelloberflächenproteinen, die einmal die Membran durchspannen, befinden sich am cytoplasmatischen Ende der hydrophoben Membran-durchspannenden Region basische Aminosäuren (Kaufman et al., 1984). Es

wird angenommen, daß die Wechselwirkung zwischen diesen positiv geladenen Resten mit den negativ geladenen Köpfen der Phospholipide mit dazu beiträgt, die Proteine in der Plasmamembran zu fixieren. Aus der Sequenz von cDNA-Klonen, die für die CSA kodieren, leitet sich eine aus 22 Aminosäuren bestehende C-terminale hydrophobe Region für das Glykoprotein ab, in der keine basischen Aminosäuren vorhanden sind (Noegel et al., 1986). Dies könnte so interpretiert werden, daß die CSA nicht durch dieses Peptid in der Plasmamembran verankert sind, sondern wie das Thyl-Glykoprotein aus Thymocyten und Neuronen (Williams und Tse, 1985) oder das VSG (variant surface glycoprotein) aus *Trypanosoma brucei* (Ferguson et al., 1985) durch Phosphatidylinositol an der Zelloberfläche befestigt sind. Dieses Lipid ist über eine Kohlenhydratkette und Äthanolamin an eine C-terminale Aminosäure von Thyl und VSG gebunden (Fig.37). Beide Proteine werden als Vorstufe mit einer C-terminalen hydrophoben Peptidsequenz synthetisiert (Cross, 1984; Seki et al., 1985), die während der Reifung der Proteine entfernt und durch das Glykolipid ersetzt wird (Bangs et al., 1985). Letzteres kann durch eine Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) von den Glykoproteinen abgespalten werden (Ferguson et al., 1985; Low und Kincade, 1985). Der Verlust der radioaktiven Markierung durch Behandlung des [^3H] Palmitinsäure-markierten Glykoproteins mit PI-PLC oder der Vergleich der aus der cDNA-Sequenzierung abgeleiteten Aminosäuresequenz mit der Sequenz eines C-terminalen Peptids der CSA könnten weitere

Hinweise dafür liefern, daß dieses Glykoprotein durch ein Glykolipid in der Plasmamembran verankert ist. Das posttranslational auf die CSA übertragene Typ2 Kohlenhydrat könnte die Kohlenhydratkomponente des Glykolipids sein.

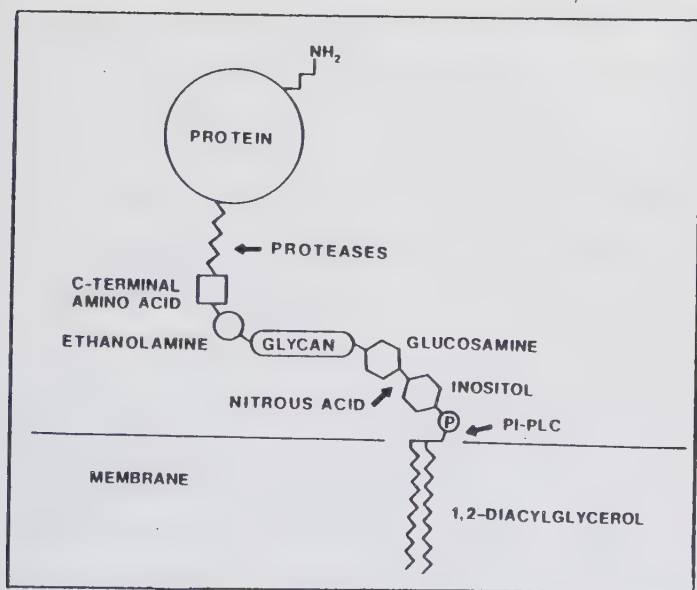


Fig.37 Die Verankerung des variant surface-Glykoproteins (VSG) in der Plasmamembran von *Trypanosoma brucei*

(aus: Low et al., 1986)

DIE ZELLFREIE SULFATIERUNG DES CSA-GLYKOPROTEINS UND SEINER 68 kDa VORSTUFE

In der vorliegenden Arbeit wurde ein System zur zellfreien Sulfatierung von Glykoproteinen aus *D.discoideum* etabliert. Dabei wurde in Übereinstimmung mit Berichten über Proteinsulfatierung in anderen Systemen (Miller und Waechter, 1979; Willadsen und Sumper, 1982; Lee und Huttner, 1983; Green et al., 1984; Merkle und Heifetz, 1984) Sulfatreste von PAPS auf endogene Akzeptoren übertragen (Fig.16). Der Sulfatdonor PAPS konnte in *D.discoideum* nachgewiesen werden (Fig.15). Das Sulfat war an Kohlenhydrate gebunden und nicht an die Polypeptidkette, da kein Tyrosinsulfat, die einzige bisher bekannte sulfatierte Aminosäure (Huttner, 1982 und Huttner, 1984), gefunden wurde. Wie in der in-vivo Sulfatierung diente von den beiden Kohlenhydrattypen des CSA-Glykoproteins Typl als Sulfatakzeptor.

In Halobakterien erfolgt die Übertragung der Sulfatreste bereits auf die lipidgebundene Oligosaccharid-Vorstufe (Lechner et al., 1985), die in ihrer sulfatierten Form an die Proteine gebunden wird. Da die 68 kDa CSA-Vorstufe Typl Kohlenhydrat schon besitzt, aber zum größten Teil noch nicht sulfatiert ist (Fig.21 und Fig.22), kann geschlossen werden, daß die Sulfatierung von Typl Kohlenhydrat erst nach dessen Übertragung auf das Protein erfolgt.

DER EINFLUSS DER GLYKOSYLIERUNG AUF DEN INTRAZELLULÄREN TRANSPORT UND DIE STABILITÄT DER CSA

Transport und Stabilität des CSA-Glykoproteins werden entscheidend von seinen Kohlenhydratketten beeinflusst. Die vollständig glykosylierte 80 kDa Form befindet sich in aggregationskompetenten Zellen zu 80% auf der Zelloberfläche. In kaum geringerem Ausmaß wird dort das teilglykosylierte 66 kDa Tunicamycinprodukt nachgewiesen. Dagegen wird das unglykosylierte 53 kDa Tunicamycinprodukt nicht auf der Zelloberfläche gefunden (Fig.29). Diese 53 kDa CSA-Form entsteht infolge der Inhibierung des cotranslationalen Glykosylierungsschrittes anstelle der 68 kDa Vorstufe von unbehandelten Wildtypzellen. Die Glykosylierung mit Typ2 Kohlenhydrat erfolgt im Golgiapparat. Wenn Tunicamycin erst 2 Stunden nach Beginn der Entwicklung gegeben wird, wird hauptsächlich die 66 kDa Form in den Zellen nachgewiesen (Fig.6 und Fig.12). Der größte Teil des 53 kDa Proteins wird also unter diesen Tunicamycinbedingungen mit Typ2 Kohlenhydrat versehen. Daraus folgt, daß der Transport des CSA-Proteins in den Golgiapparat durch das Fehlen von Typ1 Kohlenhydrat nicht verhindert wird.

Eine unspezifische Aggregation und Präzipitation als Folge einer veränderten Tertiärstruktur könnte die Ursache dafür sein, daß unglykosyliertes IgA und IgE im rauhen ER von Mäuseplasmazellen akkumuliert und eine erhebliche Vergrößerung des Kompartimentes verursacht (Hickman und Kornfeld, 1978). Auch die Tertiärstruktur des G-Proteins des

Das Fehlen von Kohlenhydratstrukturen macht sich erst bemerkbar, wenn die CSA die trans-Golgi-Zisternen erreicht haben, wo die Proteine nach ihrem Bestimmungsort getrennt in Vesikel verpackt werden, um den Golgiapparat zu verlassen. Während die vollständig glykosylierte 80 kDa Form, aber auch die teiliglykosylierte 66 kDa Form auf die Zelloberfläche gelangt (Fig.28; Fig.29), verteilt sich das unglykosylierte 53 kDa Protein auf verschiedene Membrantypen, die nicht identifiziert wurden (Fig.28). Auf die Zelloberfläche gelangt sie nicht in nachweisbaren Mengen (Fig.29). Selbst wenn unter Tunicamycin-Einfluß die unglykosylierte Form als einziges CSA-Produkt synthetisiert wird, und zwar in Mengen, die die des 80 kDa Glykoproteins in Kontrollzellen übersteigen, wurde keine Immunfluoreszenzmarkierung auf der Zelloberfläche mit Protein-spezifischen anti-CSA Antikörpern gefunden (S. Bozzaro, unveröffentlichte Ergebnisse).

Neben dem Transport können Kohlenhydratreste auch die Resistenz von Glykoproteinen gegenüber Protease-Abbau beeinflussen, was darauf zurückgeführt wird, daß exponierte potentielle Schnittstellen von den Kohlenhydratketten verdeckt werden und daher für Proteasen nicht zugänglich sind (Olden et al., 1985). Die beiden Kohlenhydrattypen auf den CSA tragen in unterschiedlicher Weise zur Stabilität des Glykoproteins bei. Während die Hemmung der Glykosylierung mit Tyl1 Kohlenhydrat durch Tunicamycin die Akkumulation der 66 kDa CSA-Form auf der Zelloberfläche nicht verhindert, ist das auf die Oberfläche der Mutanten transportierte 68 kDa Glykoprotein, dem Tyl2 Kohlenhydrat fehlt, nicht ausreichend gegen Proteaseeinwirkung geschützt. Offensichtlich werden

von Typ2 Kohlenhydrat zwei in der Primärstruktur nahe beieinander liegende Proteaseschnittstellen verdeckt, die etwa 180 Aminosäuren vom C-Terminus entfernt sind, so daß in Abwesenheit dieses Kohlenhydrattyps zwei proteolytische Fragmente mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 50 kDa, die mit Typ1 Kohlenhydrat glykosyliert sind, im Medium gefunden werden.

Während in Tunicamycin-behandelten Wildtypzellen das unglykosylierte 53 kDa Protein im Innern der Zellen akkumuliert und nur in Spuren als Ganzes oder in Form proteolytischer Degradationsprodukte im Medium gefunden wird, sind im Medium Tunicamycin-behandelter Zellen der Mutante HG220 proteolytische Fragmente enthalten. Unabhängig vom Weg auf dem die Fragmente dorthin gelangt sind, muß angenommen werden, daß ein Mechanismus, der das unglykosylierte Protein im Innern der Wildtypzellen zurückhält, in der Mutante gestört ist. Die Mutante HG220 dürfte demnach ungeeignet sein, die Funktion von Kohlenhydratketten für den intrazellulären Transport zu studieren. Ob und wie dieser Defekt mit der Hemmung der Modifizierung des Proteins durch Typ2 Kohlenhydrat verknüpft ist, kann aufgrund der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse nicht entschieden werden.

In der Mutante HG220 gelangt die 68 kDa CSA-Form in den Golgiapparat, in dem seine Sulfatierung erfolgt. Der Transport zur Plasmamembran findet ohne Glykosylierung mit Typ2 Kohlenhydrat statt. Aus den gerade erwähnten Gründen kann daraus jedoch nicht geschlossen werden, daß die zum

Transport der CSA zur Plasmamembran notwendigen Kohlenhydrate vom Typ2 durch die vom Typ1 ersetzt werden können.

Die Mutante HSB2 wurde aus einer mit MNNG mutagenisierten Population von AX2 selektioniert. Sie exprimiert die CSA zum großen Teil in der 68 kDa Form (S. Bozzaro, unveröffentlichte Ergebnisse). Die geringe Menge an 80 kDa Glykoprotein, das in dieser Mutante vorhanden ist, wird in sulfatierter Form zur Zelloberfläche transportiert, während sich die 68 kDa CSA-Form unsulfatiert im Innern der Zellen befindet. In dieser Mutante ist wahrscheinlich der Transport der im ER synthetisierten und mit Typ1 Kohlenhydrat glykosylierten CSA zum Golgiapparat, dem Ort der Sulfatierung und Modifizierung mit Typ2 Kohlenhydrat, gestört.

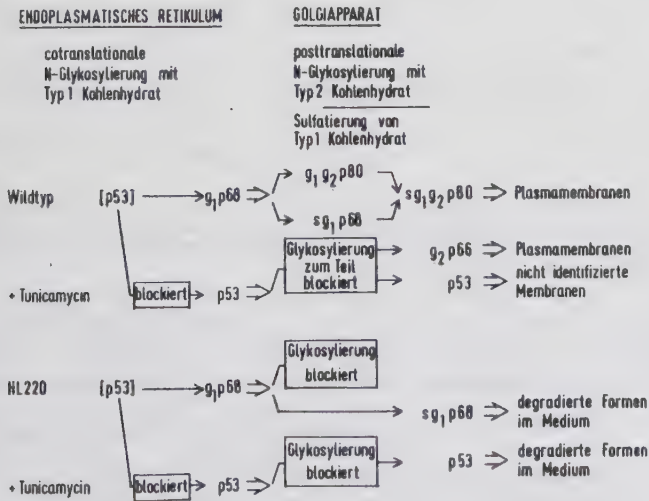
West und Loomis (1985) untersuchten mit Hilfe von Immunfluoreszenzmarkierung die Zelloberflächenexpression dreier anderer Glykoproteine in einer Mutante, die den gleichen Glykosylierungsdefekt besitzt, wie die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mutantenstämme HL220, HG220 und HG701. Die 68 kDa CSA-Form konnten die Autoren weder auf der Zelloberfläche der Mutante noch in deren Homogenat durch Immunoblotten nachweisen, was vermutlich auf der zu geringen Affinität der verwendeten anti-CSA Antikörper beruht. Die drei anderen Glykoproteine akkumulierten trotz der fehlenden Typ2 Kohlenhydrate wie im Wildtyp auf der Oberfläche der Mutante. Der Verlust dieses Kohlenhydrattyps führte hier, anders als bei den CSA, anscheinend zu keiner erhöhten Proteasesensitivität. Ob diese Proteine wie die 68 kDa

CSA-Form noch durch ein anderes Kohlenhydrat glykosyliert sind, wurde von den Autoren nicht untersucht.

Figur 39 faßt die Ergebnisse zusammen, die in der vorliegenden Arbeit über die Modifizierung des CSA-Glykoproteins durch Glykosylierung und Sulfatierung erzielt wurden. Sie zeigt, wie infolge der Inhibition der einzelnen Glykosylierungsschritte durch Tunicamycin oder durch den Defekt in den Mutanten oder durch beides zusammen die verschiedenen CSA-Formen zustande kommen. Dieses Schema bietet weiterhin einen Rahmen, in den die anderen bekannten Modifikationen der CSA, Acylierung mit Palmitinsäure (Stadler et al., 1984a) und Phosphorylierung an Serin (Coffman et al., 1981; Schmidt und Loomis, 1982), eingefügt werden können.

Fig.39 Die Reihenfolge der Glykosylierung und Sulfatierung des CSA-Glykoproteins

Das Schema, das die einzelnen Schritte in der CSA-Biosynthese und ihre intrazelluläre Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum und im Golgiapparat zeigt, leitet sich im wesentlichen ab von der Identifizierung einer teilglykosylierten 68 kDa CSA-Vorstufe und aus dem Vergleich dieser Vorstufe mit den nicht oder teilweise glykosylierten 53 kDa und 66 kDa CSA-Formen Tunicamycin-behandelter Wildtypzellen, dem 68 kDa CSA-Produkt der Mutantenzellen und der reifen 80 kDa CSA-Form des Wildtyps. In dieses Schema wurden Informationen aufgenommen, die von Gerisch und Mitarbeitern (1985a) über die Mutante HL220 und von Ochiai und Mitarbeitern (1982b) über Experimente mit Tunicamycin veröffentlicht wurden. Die Zwischenstufen und die Endprodukte sind durch ihre apparenten Molekulargewichte, einem Präfix p (für Protein) und den Symbolen ihrer Modifizierung wiedergegeben: g₁, glykosyliert mit Typ1 Kohlenhydrat; g₂, glykosyliert mit Typ2 Kohlenhydrat; s, sulfatiert (auf Typ1 Kohlenhydrat). Auf dem reifen CSA-Glykoprotein befinden sich alle diese Modifikationen. Die unglykosylierte 53 kDa Form unbehandelter Wildtyp- und Mutantenzellen wurde in Klammern gesetzt, da sie infolge der cotranslationalen Modifizierung mit Typ1 Kohlenhydrat nicht als solche existiert.



A N H A N G

In diesem Anhang werden Versuche dargestellt, die im Rahmen des Themas dieser Arbeit durchgeführt wurden, die aber nur orientierenden Charakter hatten oder sich aus anderen Gründen nicht zwanglos in eine zusammenhängende Darstellung einordnen liessen.

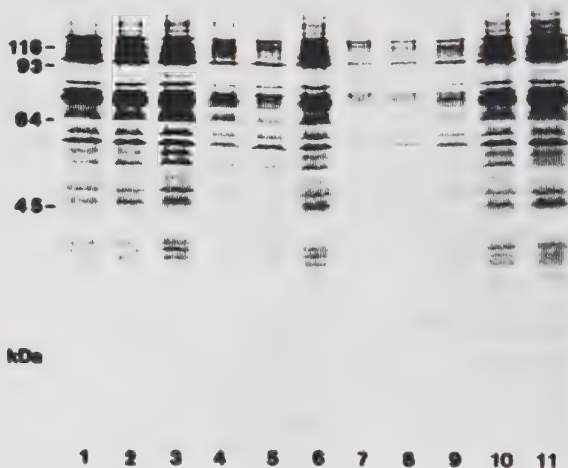


Fig. 40 Abhängigkeit der zellfreien Proteinsulfatierung von der [35 S] PAPS-Konzentration, der Reaktionstemperatur und der Anwesenheit zweiwertiger Kationen

Homogenate, die aus 3×10^6 aggregationskompetenten Wildtypzellen stammten, wurden im Standardansatz zellfrei sulfatiert, wobei die Konzentration zweiwertiger Kationen (1-4), die Temperatur (5-7) und die PAPS-Konzentration (8-11) variiert wurden. Spur1, 2 mM Mn^{2+} ; Spur2, 5 mM Mg^{2+} ; Spur3, 2 mM Mn^{2+} , 5 mM Mg^{2+} ; Spur4 keine zweiwertigen Kationen; Spur5, Reaktionstemperatur $0^{\circ}C$; Spur6, Reaktionstemperatur $22^{\circ}C$; Spur7, Reaktionstemperatur $37^{\circ}C$; Spur8, 2 μM [35 S] PAPS; Spur9, 5 μM [35 S] PAPS; Spur10, 10 μM [35 S] PAPS; Spur11, 20 μM [35 S] PAPS. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und fluorographiert. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links angegeben.

Versuche zur Optimierung der zellfreien Sulfatierungsreaktion: A. Abhängigkeit der zellfreien Sulfatierungsreaktion von divalenten Kationen, der Reaktionstemperatur und der PAPS-Konzentration

Die Übertragung von [^{35}S] Sulfatresten von exogenem [^{35}S] PAPS auf endogene Akzeptoren wird durch die zweiwertigen Kationen Mg^{2+} und Mn^{2+} stimuliert (Fig.40;1-4). Nach der gleichen Reaktionszeit waren bei 22°C (Fig.40;6) die Proteine stärker [^{35}S] Sulfat-markiert als bei 37°C (Fig.40;7) oder bei 0°C (Fig.40;5). Bei einer Erniedrigung der PAPS-Konzentration von $10\text{ }\mu\text{M}$ (Fig.40;10) auf $2\text{ }\mu\text{M}$ oder $5\text{ }\mu\text{M}$ am Beginn der Reaktion (Fig.40;8,9) ging die zellfreie Sulfatierung der endogenen Substrate zurück, während eine Erhöhung der PAPS-Konzentration über $10\text{ }\mu\text{M}$ hinaus die Reaktion nicht weiter förderte (Fig.40;11).

B. Abhängigkeit der zellfreien Sulfatierungsreaktion von der Reaktionszeit

Die [^{35}S] Sulfatmarkierung der Proteine nahm nicht linear mit der Reaktionszeit zu und war im wesentlichen nach 30 Minuten beendet (Fig.41). Von der Radioaktivität, die nach 30 Minuten Reaktionszeit in den Proteinen gefunden wurde, waren 75% schon während der ersten 15 Minuten inkorporiert worden (Fig.41). Eine zweite Zugabe von [^{35}S] PAPS 15 Minuten nach Beginn der Reaktion konnte die gesamte nach 30 Minuten auf endogene Akzeptoren übertragene Radioaktivität nur wenig erhöhen (Fig.41).

Fig.41

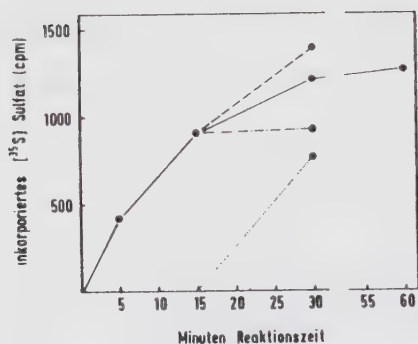


Fig.42

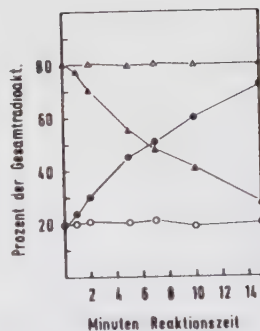


Fig.41 Zeitlicher Verlauf der [^{35}S] Sulfatinkorporation im Standard Sulfatierungsansatz

Homogenate, die aus 3×10^6 aggregationskompetenten Wildtypzellen stammten, wurden im Standardansatz 5, 15, 30 und 60 Minuten mit [^{35}S] PAPS inkubiert (durchgezogene Linie). Zu je 50 μl der Reaktionsansätze kam nach 15 Minuten Inkubation mit [^{35}S] PAPS entweder 5 μl [^{35}S] PAPS 100 μM (gestrichelte Linie) oder 5 μl unmarkiertes PAPS 1 mM (Strich-Punkt Linie). Zu einem anderen Reaktionsansatz kam [^{35}S] PAPS erst nach 15 Minuten Inkubationszeit (gepunktete Linie). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und fluorographiert. An Hand des Autoradiogramms wurde die Nitrocellulose in Streifen, die die einzelnen Spuren enthielten, geschnitten und deren Radioaktivität im Scintillationszähler bestimmt.

Fig.42 Hydrolyse von [^{35}S] PAPS im Standard Sulfatierungsansatz

Einem Sulfatierungsansatz von 100 μl Gesamtvolumen wurden zu verschiedenen Zeiten 10 μl Proben entnommen. Aus diesen wurde ein Acetonextrakt hergestellt (siehe Fig.15), dessen eine Hälfte zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität im Scintillationszähler benutzt wurde. Die andere Hälfte wurde auf PEI-Cellulose chromatographiert (siehe Fig.15) und autoradiographiert. Radioaktives Material wurde gesammelt, eluiert und im Scintillationszähler gemessen. Geschlossene Symbole, Reaktion in Gegenwart von Homogenat; offene Symbole, Reaktion in Gegenwart von Puffer; Kreise, [^{35}S] Sulfat; Dreiecke, [^{35}S] PAPS.

Eine Desulfatierung bereits markierter Proteine fand nicht statt. Wurde nach 15 Minuten Reaktionszeit durch Zugabe von nicht markiertem PAPS die spezifische Radioaktivität um das 10-fache gesenkt und damit der Einbau von radioaktivem Sulfat unterdrückt, wurde keine Abnahme der [^{35}S] Sulfatmarkierung der Proteine festgestellt (Fig.41). Kam erst nach 15 Minuten Reaktionszeit [^{35}S] PAPS zum Reaktionsansatz, war die zwischen 15 Minuten und 30 Minuten Reaktionszeit auf die Proteine übertragene Radioaktivität nur wenig geringer als die, welche zwischen 0 Minuten und 15 Minuten übertragen wurde (Fig.41). Die Sulfotransferase(n) wurde(n) also während der Reaktionszeit von 15 Minuten kaum inaktiviert. Diese Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß die zellfreie Sulfatierung von endogenen Substraten im Homogenat von *D.discoideum* durch das Fehlen weiterer, den Sulfotransferasen zugänglichen Sulfat-Akzeptoren, beendet wurde.

C. Das Cosubstrat PAPS wird während der zellfreien Sulfatierungsreaktion hydrolysiert

Während der zellfreien Sulfatierung wurde das exogene Cosubstrat [^{35}S] PAPS hydrolysiert, wobei freies [^{35}S] Sulfat entstand (Fig.42). Zu Beginn der Reaktion lagen 80% des radioaktiven Materials im Acetonextract als PAPS und 20% als Sulfat vor. Nach 15 Minuten Reaktionszeit setzte sich die Radioaktivität zu 72% aus [^{35}S] Sulfat und zu 28% aus [^{35}S] PAPS zusammen. In einem Kontrollversuch ohne Zellhomogenat war PAPS stabil.

Die für die endogene Sulfatierung verantwortlichen Komponenten können solubilisiert werden

Octyloligooxyäthylen (Rosenbusch et al., 1982) war geeignet, die endogenen 80 kDa und 68 kDa Akzeptorproteine vollständig zu solubilisieren (Fig.43B;2,5), ohne die Sulfatierungsaktivität im zellfreien System zu zerstören (Fig.43A;2). Auch die übrigen, zur Sulfatierung notwendigen Faktoren konnten in Lösung gebracht werden, so daß im Detergenzextrakt eine gewisse, wenn auch deutlich verringerte [^{35}S] Sulfatübertragung auf endogene Akzeptoren stattfand (Fig.43A;5). Die Kontrolle zeigt, daß ohne Detergenz im Überstand der 100 000xg Zentrifugation keine endogene Sulfatierungskapazität (Fig.43A;4) und weder das 80 kDa noch das 68 kDa Protein (Fig.43B;4) gefunden wurden. Bei höherer Detergenzkonzentration ging die zellfreie Sulfatierung weiter zurück (Fig.43A;3), so daß im Detergenzextrakt fast keine [^{35}S] Sulfatübertragung mehr beobachtet wurde (Fig.43A;6). Das Muster der in Anwesenheit von Detergenz [^{35}S] Sulfat-markierten Proteine (Fig.43A;2,5) glich dem im Detergenzextrakt, unterschied sich aber vom Muster der in Abwesenheit von Detergenz sulfatierten Proteine (Fig.43A;1). Das [^{35}S] Sulfat-markierte Paar oberhalb 116 kDa war noch vorhanden, jedoch kamen neue Banden bei 60 kDa, 45 kDa und 35 kDa hinzu. Besonders auffallend war das Verschwinden der Sulfatierung der 80 kDa CSA-Bande, während die 68 kDa Bande der Vorstufe noch Sulfatierung aufwies. Eine Erklärung für diese Beobachtung kann nicht gegeben werden.

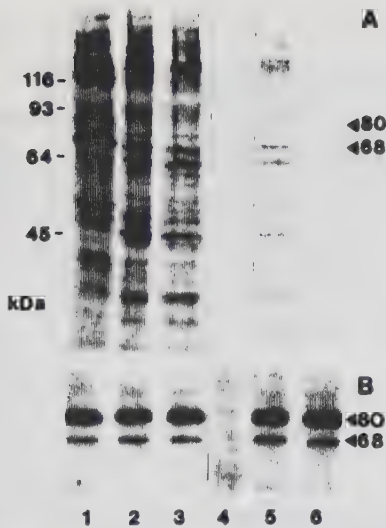


Fig.43 Solubilisierung der zur zellfreien Sulfatierung notwendigen Komponenten

Eine 100 000xg Pelletfraktion von Wildtypzellen wurde ohne Octyloligooxyäthylen (1,4), mit 0,5% (2,5) oder 1% (v/v) des Detergenz (3,6) für 30 Minuten bei 0°C inkubiert. Ein Aliquot jeder Probe wurde zellfrei sulfatiert (1-3), ein weiteres bei 100 000xg zentrifugiert und der Überstand ebenfalls zellfrei sulfatiert (4-6). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und fluorographiert (A). Anschließend wurde mit 125 J-mAk 33-294-17 markiert und autoradiographiert (B). Die aufgetragenen Proteine entsprechen 1×10^7 Zellequivalenten pro Spur. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen der 80 kDa und 68 kDa Glykoproteine sind rechts angegeben.

Änderung der zellfreien Sulfatierung während der Entwicklung

Homogenate und 100 000xg Pelletfraktionen von Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien wurden zellfrei sulfatiert (Fig.44). Während der ersten 5 Stunden der Entwicklung wurde eine generelle Zunahme der endogenen Sulfatierungskapazität beobachtet (Fig.44A). Nur wenige Proteine wurden in der 100 000xg Pelletfraktion von Zellen in der Wachstumsphase sulfatiert. Besonders fiel hier ein 65 kDa Protein auf, dessen Sulfatierung in späteren Stadien nicht mehr beobachtet wurde. Nach 5,5 Stunden und 6,5 Stunden Entwicklungszeit waren 3 Paare von Proteinen bei 130 und 115 kDa, bei 80 und 68 kDa und bei 48 und 44 kDa, besonders deutlich [^{35}S] Sulfat-markiert. Das [^{35}S] Sulfat-markierte 80/68 kDa Paar erschien gleichzeitig mit den beiden vom Protein-spezifischen anti-CSA $^{125}\text{J-mAk}$ 20-6-4 (siehe S.37 Tab.1) erkannten CSA-Formen (Fig.44B) - eine weitere Bestätigung der Identität zwischen diesem zellfrei sulfatierten Paar und der 80 kDa CSA-Form und ihrer 68 kDa Vorstufe.

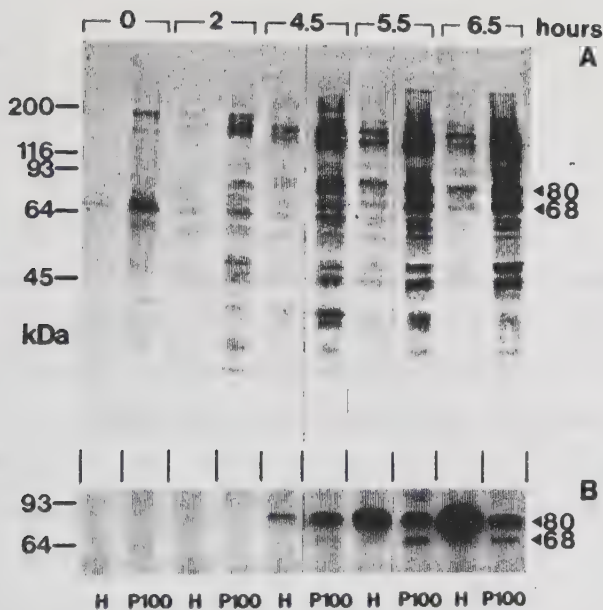


Fig.44 Änderungen der Sulfatierungskapazität (A) im Vergleich zu den Mengen an 80 kDa und 68 kDa Glykoprotein (B) während der Entwicklung

Wildtypzellen wurden zu den oben angegebenen Zeiten nach Induktion der Entwicklung geerntet. Homogenate (H) und 100 000xg Pelletfraktionen (P100) wurden im Standardansatz zellfrei sulfatiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und fluorographiert (A). Anschließend wurde mit $^{125}\text{J-mAk}$ 20-6-4 (siehe S.37 Tab.1) markiert und autoradiographiert (B). Es wurden pro Spur Equivalente von $2,5 \times 10^6$ Zellen des Homogenates und 1×10^6 Zellen der 100 000xg Pelletfraktion aufgetragen. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links angegeben, die Positionen der 80 kDa und 68 kDa Glykoproteine sind rechts angegeben.

Versuche zur Selektion von Mutanten mit Sulfatierungsdefekten: A. Abschätzung des Beitrages zur Zelloberflächenladung, der von den Sulfatresten der CSA geleistet wird

Das CSA-Glykoprotein trennt sich in 8-10 isoelektrische Varianten in der 2D-PAGE auf (Stadler, 1983; siehe Fig.25 und Fig.56), was sehr wahrscheinlich auf unterschiedliche Sulfatierung der Varianten zurückzuführen ist (siehe Seite 154). Die Verteilung des Glykoproteins auf die Varianten wurde aus der Intensität der ^{125}J Jodsignale, die nach Markierung mit mAk 33-294-17 erhalten wurden, abgeschätzt (Fig.45B). Der Sulfatgehalt der Varianten wurde aus der Intensität ihrer Sulfatmarkierung ebenfalls durch Densitometrie abgeschätzt (Fig.45A). Das Verhältnis von ^{35}S Sulfat- zu ^{125}J Jodmarkierung der Varianten zeigt (Fig.46), daß mit steigendem Sulfatgehalt ihre Acidität zunimmt.

Die am wenigsten acide 80 kDa Variante, die den gleichen isoelektrischen Punkt wie die nicht sulfatierte 68 kDa Vorstufe besitzt, wird als nicht sulfatiert betrachtet. Wenn sich die übrigen Varianten um je einen Sulfatrest voneinander unterscheiden, ergibt sich ein Gehalt von durchschnittlich etwa 3 Sulfatresten pro 80 kDa CSA-Kette (Tab.8). In aggregationskompetenten Wildtypzellen wurden 2×10^5 CSA-Moleküle pro Zelle nachgewiesen (Müller und Gerisch, 1978), die nach der Abschätzung 1×10^{-13} Coulomb zur Oberflächenladung der Zelle beitragen sollten.

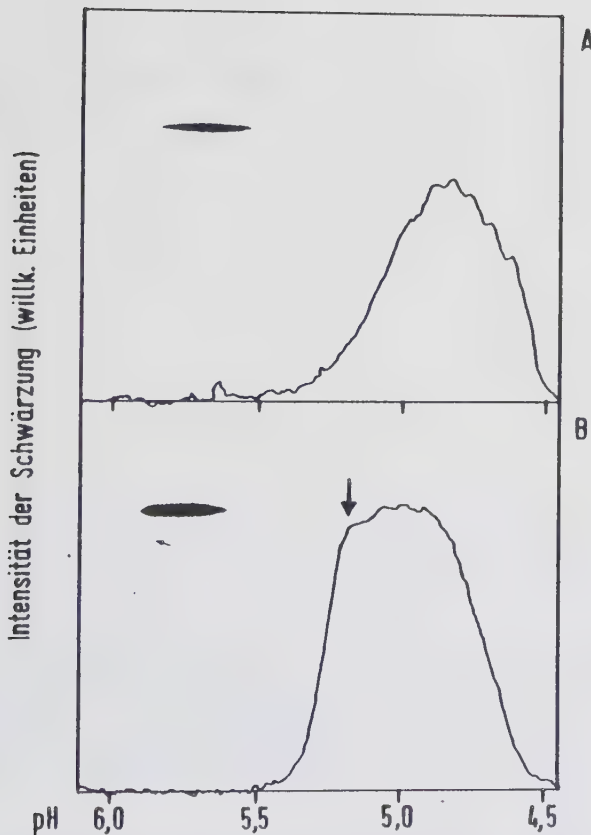


Fig.45 Markierung der isoelektrischen Varianten des CSA-Glykoproteins mit [^{35}S]Sulfat und ^{125}J -mAk 33-294-17

Ein Homogenat von 3×10^6 Wildtypzellen, die mit [^{35}S]Sulfat markiert waren, wurde durch 2D-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrozellulose transferiert und autoradiographiert (kleine eingefügte Figur in A). Derselbe Filter wurde mit ^{125}J -mAk 33-294-17 markiert und autoradiographiert (kleine eingefügte Figur in B). Es wurde sichergestellt, daß hierbei nur [^{125}J]Jodsignale detektiert wurden (siehe Methodenteil). Die Intensität der Schwärzung der Autoradiogramme, die die [^{35}S]Sulfatsignale (A) und [^{125}J]Jodsignale (B) zeigen, wurde durch Densitometrie quantifiziert. Die Pfeile zeigen die Position der 68 kDa CSA-Vorstufe. Unten ist der ungefähre pH-Bereich angegeben.

isoelektr. Variante	relative Intensität der ¹²⁵ J-mAk-Markierung (willkürliche Einheiten)	Anteil an der Gesamtintensität (%)	Sulfat- reste	Beitrag zum Gesamtsulfatgehalt (mol/mol)
1	5,8	12,9	0	0
2	6,0	13,3	1	0,133
3	6,2	13,8	2	0,276
4	6,2	13,8	3	0,414
5	6,1	13,6	4	0,544
6	5,8	12,9	5	0,645
7	4,6	10,2	6	0,612
8	2,9	6,5	7	0,455
9	1,3	2,9	8	0,232
	44,9	99,9		3,111

Tab.8 Abschätzung des durchschnittlichen Sulfatgehaltes der 80 kDa CSA-Form

Die Abschätzung des durchschnittlichen Sulfatgehaltes der 80 kDa CSA-Form erfolgte durch Bestimmung der relativen Intensität der verschiedenen isoelektrischen Varianten, die dem Densitogramm der Fig.45B entnommen wurde. Es wurde davon ausgegangen, daß das CSA-Glykoprotein aus 9 Varianten besteht, die sich um je einen Sulfatrest voneinander unterscheiden und daß die am wenigsten acide Variante nicht sulfatiert ist.

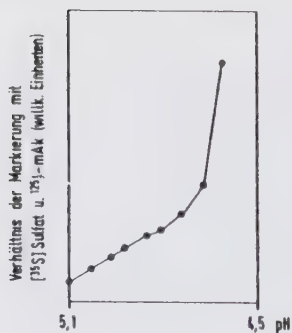


Fig.46 Mit zunehmender Acidität der isoelektrischen Varianten des 80 kDa CSA-Glykoproteins erhöht sich auch deren Sulfatgehalt

Die Intensität der Markierung der isoelektrischen Varianten des 80 kDa CSA-Glykoproteins mit $[^{35}\text{S}]$ Sulfat und ^{125}J -mAk 33-294-17 wurde aus den Densitogrammen der Figur 45 abgeschätzt und ins Verhältnis zueinander gesetzt.

B. Anreicherung von Mutanten, die eine reduzierte Oberflächenladung besitzen

Die Beweglichkeit einer Zelle unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes ist eine Funktion ihrer Oberflächenladung. Sie kann durch trägerfreie Elektrophorese bestimmt werden (Hannig, 1982). Dazu läßt man die Zellen in einem feinen, kontinuierlichen Strahl in ein Medium einfließen, das sich quer zu den Kraftlinien eines elektrischen Feldes bewegt. Die Zellen verlassen das elektrische Feld an einer Stelle, die um eine bestimmte, von der Oberflächenladung der Zellen abhängige Strecke von ihrem Eintrittspunkt in das Feld verschoben ist. Mit einer Fraktioniereinrichtung können die Zellen getrennt aufgefangen werden.

Fig.47 und Fig.48 zeigen, daß die elektrophoretische Beweglichkeit von *D.discoideum*-Zellen und somit ihre negative Oberflächenladung während der Entwicklung abnimmt. Offensichtlich wird der Beitrag der sulfatierten CSA zur Oberflächenladung, der erfahrungsgemäß eine meßbare Verschiebung des Trennprofils bewirken sollte, von positiv geladenen Molekülen, die ebenfalls während der Entwicklung auf die Zelloberfläche gelangen, überkompensiert. Es wurde jedoch eine Retardierung in der Abnahme der Beweglichkeit der Zellen zwischen 4 und 8 Stunden nach Induktion der Entwicklung beobachtet. Diese Retardierung fällt zeitlich mit der Expression der CSA auf der Zelloberfläche zusammen.

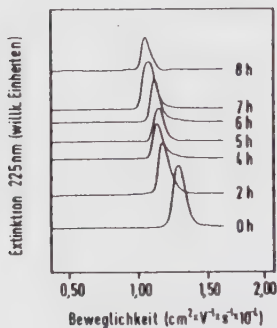


Fig. 47 Elektrophoretische Trennprofile von Wildtypzellen in der Vermehrungsphase (0 h) und in verschiedenen Stadien nach Induktion der Entwicklung (2 h-8 h)

Die Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben durch trägerfreie Elektrophorese aufgetrennt.

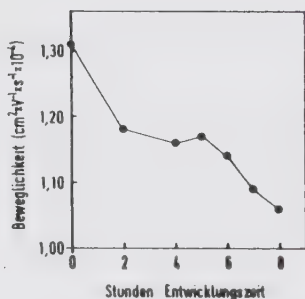


Fig. 48 Mit der Entwicklung zur Aggregationskompetenz nimmt die elektrophoretische Beweglichkeit von Wildtypzellen ab

Die elektrophoretische Beweglichkeit von Wildtypzellen in verschiedenen Entwicklungsstadien wurde den Maxima der Trennprofile der Figur 47 entnommen.

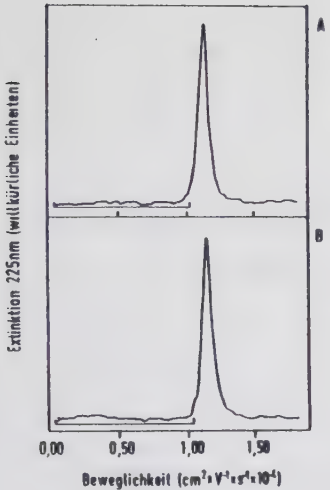


Fig.49 Präparative trägerfreie Elektrophorese mutagenisierter Zellen

Eine mit MNNG mutagenisierte Population von etwa 1×10^7 Wildtypzellen wurde durch trägerfreie Elektrophorese aufgetrennt (A). Die Zellen in den durch eine eckige Klammer gekennzeichneten Fraktionen wurden gesammelt und mit *E.coli* B/r in Suspension kultiviert. Nach 9 Generationszeiten wurden sie erneut durch trägerfreie Elektrophorese aufgetrennt (B).

Die Überlegung, daß Mutanten, die einen Defekt in der Sulfatierung ihrer Proteine oder anderer Bestandteile besitzen, eine verringerte negative Oberflächenladung aufweisen sollten, führte dazu, solche Zellen anzureichern. Dazu wurden 1×10^7 Zellen aus einer mutagenisierten Population von Wildtypzellen nach 6 Stunden Entwicklungszeit mittels trägerfreier Elektrophorese aufgetrennt. Die in Fig.49 gekennzeichneten Fraktionen, die die am wenigsten beweglichen Zellen enthielten, insgesamt etwa 3×10^5 Zellen, wurden vereinigt und die Zellen vermehrt. Nach 9 Generationszeiten wurden die Zellen bis zur Aggregationsfähigkeit entwickelt und ein zweites Mal mittels trägerfreier Elektrophorese aufgetrennt. Es wurde keine Verschiebung des Trennprofils gegenüber der ersten

Auftrennung beobachtet. Die Zellen aus den in Fig.49 gekennzeichneten Fraktionen wurden vereinigt, vermehrt und nach 9 Generationszeiten in Petrischalen in einem regelmäßigen Muster auf E.coli B/r ausplattiert.

C. Untersuchung von Klonen mutagenisierter Zellen auf Sulfatierungsdefekte durch "Colonyblot"-Technik

Die Klone von Zellen, unter denen sich durch trägerfreie Elektrophorese angereichert solche mit verminderter Oberflächenladung befinden sollten, wurden mit Hilfe der "Colonyblot"-Technik, die der von Wallraff und Mitarbeitern (1986) beschriebenen ähnlich war, auf verminderte Sulfatinkorporation untersucht. Dazu wurden die Kolonien auf Nitrozellulose abgeklascht und für 12 Stunden mit [^{35}S]Sulfat inkubiert. Fig.50A zeigt die radioaktive Markierung einiger Zellkolonien. Unter 10 000 untersuchten Klonen mutagenisierter Zellen wurde keine Mutante gefunden. Dies kann darauf beruhen, daß nicht sulfatierende Mutanten letal sind, oder darauf, daß die verwendete Technik zu ihrer Anreicherung und Identifizierung ungeeignet ist. Um die letztere Möglichkeit zu untersuchen, wurde nach [^{35}S] Sulfatmarkierung ein Stück des Nitrozellulosefilters, der eine Kolonie mit D.discoideum-Zellen enthielt und ein gleich großes Stück ohne Zellkolonie in SDS-Probenpuffer gekocht und solubilisiertes Material durch SDS-PAGE analysiert. Es wurde kein Unterschied zwischen den beiden Proben festgestellt (Fig.50B). Insbesondere wurde keine Markierung des CSA-Glykoproteins, eines der am stärksten sulfatierten

Proteine in aggregationskompetenten *D.discoideum*-Zellen, gefunden. Die Radioaktivität befand sich zum größten Teil in der Lauffront des Gels. Die Sulfatierung der Glykoproteine dürfte demnach auf dem Hintergrund niedermolekularer ^{35}S -markierter Verbindungen schwer zu erkennen sein. Eine Sulfatierungs-defekte Mutante ist also mit der hier beschriebenen Technik wahrscheinlich nicht zu identifizieren.

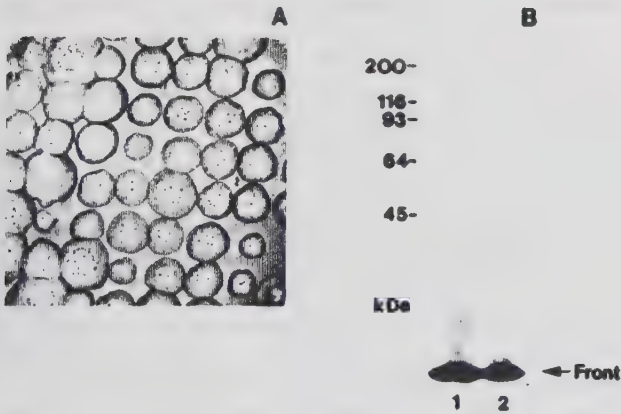


Fig.50 [^{35}S] Sulfateinbau in Kolonien mutagenisierter Zellen

Die Zellen in den durch eckige Klammern gekennzeichneten Fraktionen der Fig.49 wurden gesammelt, in Petrischalen ausplattiert und mit *E.coli* B/r kultiviert. Sobald die Zellkolonien sich berührten, wurden sie auf Nitrozellulosefilter abgeklatscht, für 12 Stunden mit [^{35}S] Sulfat inkubiert und die Filter autoradiographiert (A). Ein Stück des Filters, das eine Kolonie von *D.discoideum*-Zellen enthielt, wurde in Probenpuffer (Lämmli, 1970) gekocht und solubilisiertes Material durch SDS-PAGE analysiert (B;1). Zur Kontrolle wurde ein gleich großes Filterstück, das keine *D.discoideum*-Zellen enthielt, in Probenpuffer gekocht und ebenfalls durch SDS-PAGE analysiert (B;2).

Inhibition der Sulfatierung des CSA-Glykoproteins durch Selenat- und Chlorationen und reduzierte Sulfatierung in der Mutante HG702

Selenat- und Chlorationen können als Sulfatanaloga die ATP-Sulfonylase hemmen (Hickman und Kornfeld, 1978; Huttner und Bäuerle, 1986), die im ersten Schritt der PAPS-Synthese anorganisches Sulfat auf ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat überträgt (Hilz und Lipmann, 1955). Es kommt zu einem Absinken der PAPS-Konzentration in den Zellen und somit zu einer Inhibition der Proteinsulfatierung. Es wurde untersucht, ob die Sulfatierung des CSA-Glykoproteins durch diese Ionen verhindert werden kann. Dazu wurden Zellen, die sich in Anwesenheit von Selenat- oder Chlorationen entwickelten, mit [^{35}S] Sulfat inkubiert. Durch 0,1 mM Selenationen wurde die Inkorporation von [^{35}S] Sulfat in das CSA-Glykoprotein im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen um 96% reduziert (Fig.51A;1,2 und Tab.9). Unter diesen Bedingungen waren noch 80% der CSA in den Zellen vorhanden (Fig.51B;1,2 und Tab.9). Eine Erhöhung der Selenationenkonzentration auf 1 mM hemmte die Synthese des CSA-Glykoproteins stark (Fig.51B;3 und Tab.9). Sulfatierte Banden waren bei dieser Selenationenkonzentration nicht mehr vorhanden.

Durch Inkubation sich entwickelnder Zellen mit Chlorationen konnte die [^{35}S] Sulfatinkorporation ebenfalls gehemmt werden (Fig.52A und Tab.9), doch war in diesen

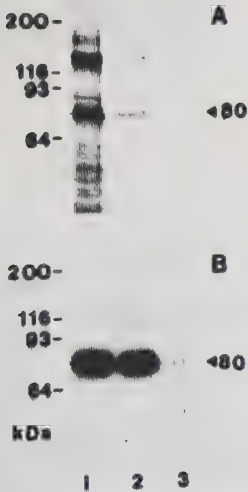


Fig.51 Inhibition der [35 S] Sulfatinkorporation in das 80 kDa Glykoprotein durch Selenationen

Sich entwickelnde Wildtypzellen wurde ohne (1) und in Anwesenheit von 0,1 mM (2) oder 1 mM (3) Selenationen mit [35 S] Sulfat inkubiert. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und inkorporiertes [35 S] Sulfat durch Autoradiographie detektiert (A). Derselbe Filter wurde mit 125 J-mAk 33-294-17 markiert und erneut autoradiographiert (B). Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Position des 80 kDa Glykoproteins ist rechts angegeben.

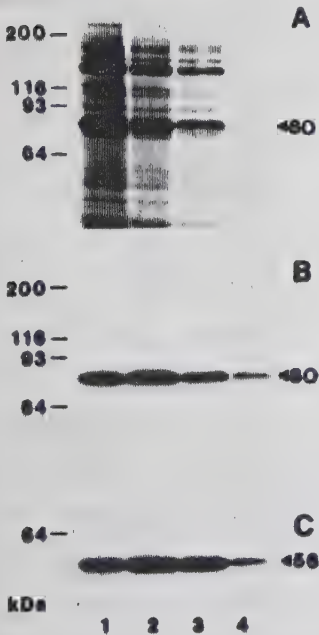


Fig.52 Inhibition der [35 S] Sulfatinkorporation in das 80 kDa Glykoprotein durch Chlorationen

Sich entwickelnde Wildtypzellen wurden mit [35 S] Sulfat in Abwesenheit von Natriumchlorat (1) oder mit 7,5 mM (2), 20 mM (3) und 50 mM (4) Natriumchlorat inkubiert. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Das inkorporierte [35 S] Sulfat wurde durch Autoradiographie detektiert (A). Der Filter wurde dann mit 125 J-mAk 33-294-17 markiert und erneut autoradiographiert (B). Anschließend wurde zur Markierung des 56 kDa Membranproteins mit 125 J-mAk 83-418-1 inkubiert und ein drittes Mal autoradiographiert (C). Es wurden pro Spur Proteine aus 1×10^6 Zellen aufgetragen. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen des 80 kDa Glykoproteins und des 56 kDa Proteins sind rechts angegeben.

Inhibition der [35 S] Sulfat-		inkorporiertes	gebundener	Inhibition
markierung durch		[35 S] Sulfat	[125 J] mAk	%
		cpm (%)	cpm (%)	
Selenationen	1,0 mM	- -	89 (2)	100
	0,1 mM	132 (3)	3664 (80)	96
	Kontrolle	3885 (100)	4608 (100)	0
Chlorationen	50 mM	70 (1)	598 (24)	96
	20 mM	810 (13)	1286 (62)	78
	8 mM	2336 (40)	2728 (132)	69
	Kontrolle	5882 (100)	2073 (100)	0

Tab.9 Inhibition der [35 S]Sulfatmarkierung der CSA durch Selenat- und Chlorationen

Aus den Filtern, die in den Figuren 51 und 52 benutzt wurden, wurden die 80 kDa Banden ausgeschnitten und gebundener 125 J-mAk 33-294-17 im γ -Zähler bestimmt. Zur Bestimmung von inkorporiertem [35 S] Sulfat wurden duplikate Filter, die nicht mit Antikörper inkubiert worden waren, benutzt. Die 80 kDa Banden wurden ausgeschnitten und die Radioaktivität im Scintillationszähler bestimmt.

Zellen der Gehalt an CSA-Glykoprotein drastisch reduziert (Fig.52B und Tab.9). So wurde durch 50 mM Chlorationen die [35 S] Sulfatmarkierung des CSA-Glykoproteins praktisch vollständig inhibiert (Fig.52A;4 und Tab.9), doch auch dessen Menge war im Vergleich zu Kontrollzellen um 76% zurückgegangen (Fig.52B;4 und Tab.9). Auch ein anderes entwicklungsreguliertes Membranprotein mit einem apparenten Molekulargewicht von 56 kDa, das von mAk 83-418-1 erkannt wird, war in den Zellen in deutlich geringerer Menge vorhanden (Fig.52C). Chlorat hemmte also unter Bedingungen, die die Sulfatierung inhibierten, auch stark die Proteinsynthese.

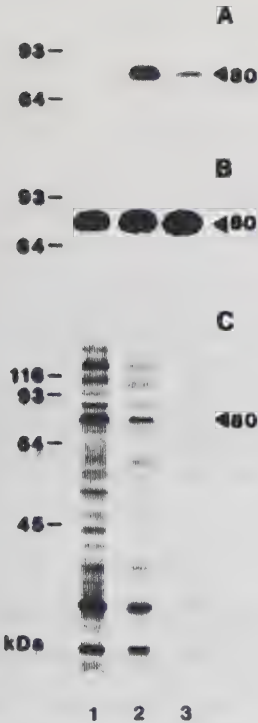


Fig.53 In der Mutante HG702 ist die Inkorporation von [35 S] Sulfat während der Entwicklung reduziert

AX2 Wildtypzellen (1), Zellen der Mutante HG702 (3) und ihres Elternstammes HG592 (2) entwickelten sich für 4 Stunden in Anwesenheit von [35 S] Sulfat. Am Beginn der Sulfatinkubation, 2 Stunden nach Induktion der Entwicklung (A) und am Ende der Inkubation (B) wurden Proben zur Bestimmung des CSA-Glykoproteins mit mAk 33-294-17 entnommen. Inkorporiertes [35 S] Sulfat wurde durch Autoradiographie detektiert (C). Die Zellen wurden lysiert, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Für B wurde der für C verwendete Filter mit dem Antikörper markiert und erneut autoradiographiert (B). Es wurden pro Spur Proteine aus 1×10^6 Zellen aufgetragen. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Position des 80 kDa Glykoproteins ist rechts angegeben.

Stamm		inkorporiertes [³⁵ S] Sulfat cpm (%)	Bezugs- grösse cpm (%)	Inhibition %
HG702	vegetativ	197	10757	89
HG702	6 Stunden nach Induktion der Entwicklung	262 (3)	7487 (111)	97
HG592	vegetativ	n.b.	n.b.	n.b.
HG592	6 Stunden nach Induktion der Entwicklung	1978 (25)	7101 (105)	76
AX2	vegetativ	2061	12364	0
AX2	6 Stunden nach Induktion der Entwicklung	7912 (100)	6763 (100)	0

Tab.10 Sulfatierungsdefekt in der Mutante HG702

Die [³⁵S] Sulfatmarkierung der 80 kDa CSA-Form in Zellen der Mutanten HG702, HG592 und des Wildtyps AX2 6 Stunden nach Induktion der Entwicklung wurde wie in der Legende zu Tab.9 beschrieben aus den Filtern, die in den Figuren 53 und 54 benutzt wurden, bestimmt. In vegetativen Zellen der Mutante HG702 und des Wildtyps AX2 wurde die Sulfatinkorporation in alle Proteine, die in den entsprechenden Spuren der Fig.54 vorhanden waren, insgesamt bestimmt. Als Bezugsgröße für das Ausmaß der Neusynthese von Proteinen in diesen Zellen während der Inkubation mit [³⁵S] Sulfat wurde die Markierung der Proteine mit [³H] Prolin in dieser Zeit gewählt. In sich entwickelnden Zellen wurde wie in Tab.9 das in die CSA inkorporierte [³⁵S] Sulfat auf die vorhandene Menge dieses Glykoproteins bezogen.

Die Mutante HG702, die aus einer mutagenisierten Population des Stammes HG592 isoliert wurde (M. Yoshida, unveröffentlichte Ergebnisse), zeigt im Vergleich zum Wildtyp AX2 (Fig. 53C;1 und Tab.10) einen deutlichen Rückgang der [³⁵S] Sulfatmarkierung nicht nur des CSA-Glykoproteins, sondern auch der übrigen [³⁵S] Sulfat-markierten Proteine, wenn die Zellen sich in Anwesenheit von [³⁵S] Sulfat entwickelt hatten (Fig.53C;3 und Tab.10). Der CSA-Gehalt der Mutante (Fig.53B;3 und Tab.10) war gegenüber dem des Wildtyps (Fig.53B;1 und Tab.10) nicht reduziert. Die im

Vergleich zum Wildtyp geringere Sulfatierung der CSA im Elternstamm HG592 (Fig.53C;2) der Mutante läßt sich damit erklären, daß in dem für die Sulfatmarkierung gewählten Entwicklungsstadium weniger von diesem Glykoprotein synthetisiert wurde als im Wildtyp. Die CSA, die von $^{125}\text{J-mAk}$ 33-294-17 nach 6 Stunden Entwicklungszeit detektiert wurden (Fig.53B;2) und in ihrer Menge etwa denen des Wildtyps entsprachen, waren zum Teil schon zu Beginn der Inkubation mit ^{35}S Sulfat vorhanden (Fig.53A;2). Dies war in der Mutante HG702 kaum (Fig.53A;3) und im Wildtyp nicht der Fall (Fig.53A;1).

Es wurde auch untersucht, ob die Mutante HG702 die während der Entwicklung beobachtete Störung der Proteinsulfatierung auch in der Vermehrungsphase zeigt. Nach Inkubation von Zellen der Mutante mit ^{35}S Sulfat für 36 Stunden während der Vermehrungsphase waren viele der ^{35}S Sulfat-markierten Banden der Kontrollzellen nicht markiert oder zeigten - wie bei einer 47 kDa und einer 30 kDa Bande beobachtet - eine erniedrigte Markierungsintensität (Fig.54;1,3). Um bei der Mutante und dem Wildtyp die Menge von inkorporiertem Sulfat auf gleiche Mengen neu synthetisierter Proteine beziehen zu können, wurden parallel kultivierte Zellen mit ^3H Prolin markiert (Fig.54; 2,4).

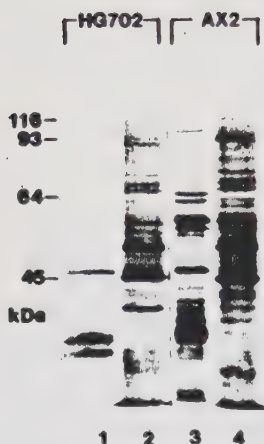


Fig.54 In der Mutante HG702 ist die Inkorporation von [35 S] Sulfat auch in der vegetativen Phase reduziert

Zellen der Mutante HG702 (1,2) und des Wildtyps AX2 (3,4) vermehrten sich unter gleichen Bedingungen in Anwesenheit von [35 S] Sulfat (1,3) oder [3 H]Prolin (2,4). Die Zellen wurden durch Einfrieren und Auftauen lysiert, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und fluorographiert. Von den [3 H]Prolin markierten Zellen beider Stämme wurden Equivalente, die 15 000 mit Aceton präzipitierbare cpm enthielten aufgetragen und entsprechende Mengen der [35 S] Sulfat-markierten Zellen eingesetzt. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links angegeben.

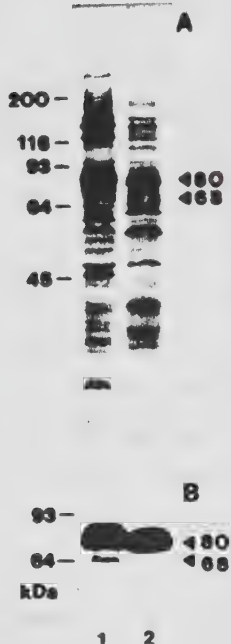


Fig.55 Zellfreie Sulfatierung in der Mutante HG702

Homogenate von AX2 Wildtypzellen (1) und Zellen der Mutante HG702 (2), die 6 Stunden nach Induktion der Entwicklung geerntet worden waren, wurden im Standardansatz zellfrei sulfatiert. Die Proteine von $2,5 \times 10^6$ Zellen, wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und fluorographiert. Anschließend wurde der Filter mit 125 J-mAk 33-294-17 inkubiert und autoradiographiert (B). Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen der 80 kDa und 68 kDa Glykoproteine sind rechts angegeben.

Um zu untersuchen, ob in der Mutante HG702 von den verschiedenen zur *in vivo* Sulfatierung notwendigen Funktionen auch solche betroffen sind, die zur zellfreien Sulfatierung gebraucht werden, wurde ein Homogenat dieser Mutante im Standardansatz zellfrei sulfatiert (Fig.55A). Es war endogene Sulfatierungskapazität vorhanden. Das Muster der [^{35}S] Sulfatbanden im Homogenat der Mutante (Fig.55A;2) unterschied sich jedoch von dem der Kontrollzellen (Fig.55A;1). Die im Wildtyp dominierenden Banden bei 130 kDa und 150 kDa und die des 80 kDa Glykoproteins hatten in der Mutante an Intensität verloren, Banden bei 62 kDa und 58 kDa und im 30-40 kDa Bereich dagegen hatten an Intensität gewonnen. Fig.55B zeigt das Vorhandensein von 80 kDa und 68 kDa Glykoprotein im Wildtyp und in der Mutante.

Kürzlich wurde berichtet, daß Zellen von *D.discoideum* durch Inkubation mit Selenationen in ihrem Wachstum stark beeinträchtigt sind. Ihre Entwicklung in Gegenwart von Selenat ist jedoch kaum gestört (Davis und Wheldrake, 1985). Die Autoren beobachteten infolge der Selenatbehandlung einen verringerten Einbau von [^{35}S] Sulfat in die während der Zellvermehrung synthetisierten Proteine, wenn das markierte Sulfat im Medium vorhanden war. Daraus schlossen sie, daß die Proteinsulfatierung für das Wachstum der Zellen notwendig ist. Für diese Vermutung spricht das stark gehemmte Wachstum der Sulfatierungs-gestörten Mutante HG702 (M. Yoshida, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Koinzidenz von verringerter Sulfatinkorporation und gehemmtem Wachstum kann jedoch nur ein Hinweis auf einen kausalen Zusammenhang

sein. Die Selenationen könnten neben der Sulfatierungs-inhibition die Zellen noch in anderer Weise schädigen. Die Mutante könnte mehrere Defekte aufweisen, die auf voneinander unabhängigen Mutationen beruhen.

Welche von den zur Proteinsulfatierung notwendigen Funktionen in der Mutante ausgefallen ist, ist ebenfalls nicht geklärt. Wie die zellfreie Sulfatierung zeigt, verfügt die Mutante über endogene Sulfatierungskapazität, also über aktive Sulfotransferase(n) und über Sulfatakzeptorproteine. Auffallend ist das unterschiedliche Muster zellfrei sulfatierter Proteine in Wildtyp und Mutante.

Die Sulfatierung ist die Ursache für die isoelektrische Inhomogenität des CSA-Glykoproteins

Das hochsulfatierte CSA-Glykoprotein zeigt eine ausgeprägte isoelektrische Inhomogenität mit Varianten, die zwischen pH 5,1 und 4,6 fokussieren (Stadler et al., 1983), während die nicht sulfatierten 53 kDa und 66 kDa Produkte aus Tunicamycin-behandelten Wildtypzellen isoelektrisch homogen sind und bei pH 5,1 fokussieren (Bertholdt et al., 1985). Damit liegt die Vermutung nahe, daß der unterschiedliche Sulfatierungsgrad die isoelektrische Inhomogenität des CSA-Glykoproteins verursachen könnte. Um dies zu überprüfen wurde eine Membranfraktion [^{35}S]Sulfat-markierter Zellen, die sich in Gegenwart von 50 mM Chlorationen entwickelt hatten und unabhängig davon eine Membranfraktion [^{35}S]Sulfat-markierter Zellen der Sulfatierungs-gestörten Mutante HG702 durch 2D-PAGE aufgetrennt. Während sich die noch vorhandene

geringe [^{35}S] Sulfatmarkierung der CSA aus der Mutante HG702 (Fig.56A;702) und aus den Chlorat-behandelten Wildtypzellen (Fig.56A;AX2CH) isoelektrisch inhomogen wie im Wildtyp erwies (Fig.56A;AX2), zeigte die Antikörpermarkierung (Fig.56B), daß die Hauptmenge des Glykoproteins einheitlich bei pH 5,1 fokussierte.



Fig.56 Isoelektrische Varianten des 80 kDa Glykoproteins von unbehandelten und Chlorat-behandelten Wildtypzellen und von unbehandelten Zellen der Mutante HG702

Sich entwickelnde AX2 Wildtypzellen wurden ohne (AX2) und in Anwesenheit von 50 mM Natriumchlorat (AX2CH), entsprechende Zellen der Mutante HG702 (HG702) ohne Chlorat mit [^{35}S] Sulfat inkubiert. Die Zellen wurden lysiert, eine Membranfraktion hergestellt, die Proteine durch 2D-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und 2 Tage autoradiographiert (AX2, AX2CH) oder 20 Tage fluorographiert (HG702) (A). Anschließend wurden die Filter mit $^{125}\text{J-mAk}$ 33-294-17 markiert und autoradiographiert. Es wurden pro Gel Proteine aus 3×10^6 Zellen (AX2 und AX2CH) oder 1×10^6 Zellen (HG702) aufgetragen. Unten ist der ungefähre pH-Bereich der gezeigten Gelausschnitte angegeben. Die Position des 80 kDa Glykoproteins in der SDS-PAGE-Dimension ist rechts angegeben.

Die Sulfatierung ist nicht die Ursache der Endoglykosidaseresistenz der Typl Kohlenhydrate in der 80 kDa CSA-Form

Die Typl Kohlenhydratreste der 68 kDa CSA-Vorstufe sind Endoglykosidase-sensitiv. Im reifen 80 kDa Glykoprotein dagegen werden sie nicht von den Endoglykosidasen F und H angegriffen. Dieser Kohlenhydrattyp ist in der 80 kDa CSA-Form, aber nicht in der 68 kDa Vorstufe sulfatiert. Es wurde berichtet, daß die lysosomalen Enzyme von *D. discoideum* durch die Sulfatierung resistent gegen Endoglykosidaseabbau werden (Freeze et al., 1983). Es lag also nahe zu überprüfen, ob die Sulfatierung die Ursache der Endoglykosidaseresistenz des 80 kDa Glykoproteins ist. Dazu wurde eine 100 000xg Pelletfraktion von Wildtypzellen zellfrei [³⁵S] Sulfat-markiert und anschließend in Gegenwart von SDS mit Endoglykosidase F (endo F) behandelt (Fig.57A). Die [³⁵S] Sulfatmarkierung sowohl des 80 kDa als auch des 68 kDa Glykoproteins war nach Endoglykosidase F-Behandlung weitgehend verloren gegangen. Es tauchten auch keine [³⁵S] Sulfat-markierten Abbauprodukte auf. Die [³⁵S] Sulfat-markierten Produkte, die durch Endoglykosidase F-Behandlung entstanden waren, hatten also ein so niedriges Molekulargewicht, daß sie nach SDS-PAGE nicht mehr nachzuweisen waren. Das verwendete Endoglykosidase F Präparat war nicht mit einer Sulfataseaktivität kontaminiert, wie die Inkubation einer Membranfraktion von in vivo [³⁵S] Sulfat-markierten Zellen mit diesem Präparat (endo F) zeigt (Fig.57C). Die Antikörpermarkierung zeigt die Resistenz des 80 kDa

Glykoproteins und die Sensitivität der 68 kDa Vorstufe gegenüber der Endoglykosidase (Fig.57B).

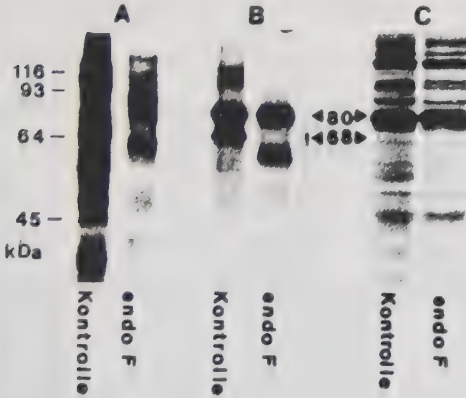


Fig.57 Die zellfrei sulfatierten Kohlenhydrate des CSA-Glykoproteins werden von Endoglykosidase F angegriffen

Eine im Standardansatz zellfrei [^{35}S] Sulfat-markierte 100 000xg Pelletfraktion (A,B) und ein Homogenat in vivo [^{35}S] Sulfat-markierter Zellen des Wildtyps (C) wurden ohne (Kontrolle) und mit Endoglykosidase F (endo F) inkubiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und fluorographiert (A) oder autoradiographiert (C). Anschließend an die Fluorographie wurde mit ^{125}I -mAk 33-294-17 markiert und autoradiographiert (B). Es wurden pro Spur Proteine aus 1×10^7 (A,B) oder 1×10^6 (C) Zellen aufgetragen. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links, die Positionen der 80 kDa und der 68 kDa Glykoproteine sind zwischen B und C angegeben.

Der Verlust der zellfrei auf die CSA übertragenen [^{35}S] Sulfatreste, der auf den Abbau der Typl Kohlenhydrate, an die das Sulfat gebunden war, zurückzuführen ist, zeigt, daß die Kohlenhydrate, die im zellfreien System sulfatiert worden waren, durch die Sulfatierung nicht gleichzeitig endoF

resistent wurden. Die Sulfatierung per se kann also nicht für die Endoglykosidase F-Resistenz der Typl Kohlenhydrate im reifen CSA-Glykoprotein verantwortlich sein. Interessant ist, daß auch das 80 kDa Glykoprotein seine zellfrei erworbene [³⁵S] Sulfatmarkierung verloren hat. Die entsprechende Abnahme der 80 kDa und das Auftreten der 66 kDa CSA-Form kann in der Antikörpermarkierung nicht verfolgt werden, da nur ein verschwindend kleiner Teil des CSA-Glykoproteins in der zellfreien Sulfatierung erfaßt wird (siehe Fig.25 und Fig.26). Offensichtlich hat dieser kleine, zellfrei sulfatierbare Teil des 80 kDa Glykoproteins die Resistenz gegen Endoglykosidase F noch nicht erworben.

Das 68 kDa Glykoprotein ist nicht identisch mit einem anderen, dem CSA-Glykoprotein immunologisch verwandten 68 kDa Zelladhäsionsmolekül

Hirano und Mitarbeiter (1984) extrahierten aggregationsfähige Zellen von *D.discoideum* mit Phenol. Aus dem Phenol-extrahierten Rückstand der Zellen wurde ein 68 kDa Protein durch Wasser gelöst. Ein gegen dieses Protein gerichtetes Antiserum reagierte auch mit dem 80 kDa CSA-Glykoprotein und blockierte die EDTA-stabile Zelladhäsion, wenn die Zellen nach Springer und Mitarbeitern (1980) mit einem Komplex aus IgG und anti-IgG-Fab inkubiert wurden. Um zu untersuchen, ob das von Hirano und Mitarbeitern beschriebene 68 kDa Protein mit der vom mAk 33-294-17 erkannten 68 kDa Vorstufe des CSA-Glykoproteins identisch ist, wurde eine Phenolextraktion nach dem

Protokoll von Hirano und Mitarbeitern durchgeführt. Weder im Rückstand der Phenolextraktion (Fig.58;2) noch im wasserlöslichen Extrakt des Rückstandes (Fig.58;3,4) waren die im Zellhomogenat (Fig.58;1) vom Antikörper markierten 80 kDa und 68 kDa Glykoproteine nachweisbar.

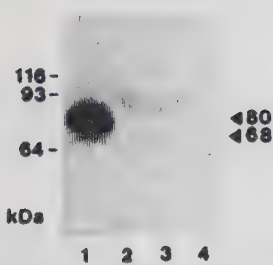


Fig.58 Das 68 kDa Glykoprotein kann nicht durch Phenolextraktion angereichert werden

Aggregationskompetente Wildtypzellen wurden wie von Hirano und Mitarbeitern (1984) beschrieben lyophilisiert und das trockene Material mit Phenol extrahiert. Der Rückstand wurde in destilliertem Wasser aufgenommen und wasserunlösliches Material abzentrifugiert. Proteine aus dem Zellhomogenat (1), aus dem Rückstand nach Phenolextraktion (2) und aus der wasserlöslichen Fraktion des Rückstandes (3,4) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert, mit mAk 33-294-17 markiert und autoradiographiert. Es wurden Proteine aus 1×10^6 Zellequivalenten (1-3) und 5×10^7 Zellequivalenten aufgetragen (4).

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Bangs, J.D., D. Hereld, J.L. Krakow, G.W. Hart und P.T. Englund: Rapid processing of the carboxyl terminus of a trypanosome variant surface glycoprotein. Proc.Natl.Acad. Sci. USA 82, 3207-3211 (1985)

Beaufay, H. und A. Amar-Costesec: Cell fractionation techniques. In: Methods in Membrane Biology ed. Korn, E.D. (Plenum Press, New York) pp. 1-100 (1976)

Bertholdt, G., J. Stadler, S. Bozzaro, B. Fichtner und G. Gerisch: Carbohydrate and other epitopes of the contact site A glycoprotein of Dictyostelium discoideum as characterized by monoclonal antibodies. Cell Differ. 16, 187-202 (1985)

Beug, H., F.E. Katz und G. Gerisch: Dynamics of antigenic membrane sites relating to cell aggregation in Dictyostelium discoideum. J. Cell Biol. 56, 647-658 (1973)

Blobel, G. und B. Dobberstein: Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. J. Cell Biol. 67, 852-862 (1975)

Bolton, A.E.: Proteinmarkierungstechniken. Review 18 (Amersham Buchler, Braunschweig) (1979)

Bozzaro, S. und G. Gerisch: Contact sites in aggregating cells of Polysphondylium pallidum. J. Mol. Biol. 120, 265-279 (1978)

Bozzaro, S. und R. Merkl: Monoclonal antibodies against Dictyostelium plasma membranes: their binding to simple sugars. Cell Differ. 17, 83-94 (1985)

Burger, M.M. und J. Jumblatt: Membrane involvement in cell-cell interactions: A two component model system for

cellular recognition that does not require live cells. In: Cell and Tissue Interactions, eds. Lash, J.W. und Burger, M.M. (Raven Press, New York) pp. 155-172 (1977)

Coffman, D.S., B.H. Leichtling und H.V. Rickenberg: Phosphoproteins in *Dictyostelium discoideum*. J. Supramol. Struct. Cell. Biochem. 15, 369-385 (1981)

Coffman, D.S., B.H. Leichtling und H.V. Rickenberg: The phosphorylation of membranal proteins in *Dictyostelium discoideum* during development. Dev. Biol. 93, 422-429 (1982)

Cross, G.A.M.: Structure of the variant glycoproteins and surface coat of *Trypanosoma brucei*. Phil.Trans.R.Soc.London, Ser. B. 307, 3-12 (1984)

Damsky, C.H., K.A. Knudsen und C.A. Buck: Integral membrane glycoproteins in cell-cell and cell-substratum adhesion. In: The Biology of Glycoproteins, ed. Ivatt, R.J. (Plenum Press, New York) pp. 1-63 (1984)

Danielsen, E.M. und G.M. Cowell: Biosynthesis of intestinal microvillar proteins. FEBS Lett. 166, 28-32 (1984)

Davis, S.J. und J.F. Wheldrake: The sulphation inhibitor sodium selenate arrests the growth of *Dictyostelium discoideum*. FEMS Let. 30, 353-358 (1985)

De Duve, C., B.C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux und F. Appelmans: Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. Biochem. J. 60, 604-617 (1955)

De Meio, R.H.: Sulfate Activation and Transfer. In: Metabolism of sulfur compounds, ed. D. M. Greenberg (Academic, New York) pp. 287-358 (1975)

Dottavio-Martin, D. und J.M. Ravel: Radiolabeling of proteins by reductive alkylation with [^{14}C]formaldehyde and sodium cyanoborohydride. *Anal. Biochem.* 87, 562-565 (1978)

Duppel, W., J.-M. Lebeault und M.J. Coon: Properties of a yeast cytochrome P-450-containing enzyme system which catalyzes the hydroxylation of fatty acids, alkanes, and drugs. *Eur. J. Biochem.* 36, 583-592 (1973)

Edelman, G.: Cell adhesion molecules. *Science* 219, 450-457 (1983)

Eitle, E. und G. Gerisch: Implication of developmentally regulated concanavalin A binding proteins of *Dictyostelium* in cell adhesion and cyclic AMP regulation. *Cell Differ.* 6, 339-346 (1977).

Elder, J.H. und S. Alexander: endo- $\text{-N-Acetylglucosaminidase F}$: Endoglycosidase from *Flavobacterium meningosepticum* that cleaves both high-mannose and complex glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4540-4544 (1982)

Farquahr, M.G. und G.E. Palade: The Golgi apparatus (complex) - (1954-1981) - from artifact to center stage. *J. Cell Biol.* 91, 77s-103s (1981).

Ferguson, M.A.J., M.G. Low und G.A.M. Cross: Glycosyl-sn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 260, 14547-14555 (1985)

Ferro-Novick, S., W. Hansen, I. Schauer und R. Schekman: Genes required for completion of import of proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J. Cell Biol.* 98, 44-53 (1984)

Figura, K. von und A. Hasilik: Genesis of lysosomal enzyme deficiencies. *TIBS* 9, 29-31 (1984)

Fischer, H.D., A. Gonzalez-Noriega, W.S. Sly und D.J. Morre: Phosphomannosyl-enzyme receptors in rat liver. J. Biol.Chem. 255, 9608-9615 (1980)

Frazier, W.A., S.D. Rosen, R.W. Reitherman und S.H. Barondes: Purification and comparison of two developmentally regulated lectins from *Dictyostelium discoideum*: Discoidin I and II. J. Biol. Chem. 250, 7714-7721 (1975)

Freeze, H.H., R. Yeh, A.R. Miller und S. Kornfeld: Structural analysis of the asparagine-linked oligosaccharides from three lysosomal enzymes of *Dictyostelium discoideum*. J. Biol. Chem. 258, 14874-14879 (1983)

Gabel, C. A., D.E. Goldberg und S. Kornfeld: Identification and characterization of cells deficient in the mannose 6-phosphat receptor: Evidence for an alternate pathway for lysosomal targeting. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 775-779 (1983)

Gallin, W.J., G.M. Edelman und B.A. Cunningham: Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1038-1042 (1983).

Gentry, M.K. und R.A. Olsson: A simple, specific, radiolabeled assay for 5'-nucleotidase. Anal. Biochem. 64, 624-627 (1975).

Gerisch, G.: Zellfunktionen und Zellfunktionswechsel in der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum*. V. Stadienspezifische Zellkontaktbildung und ihre quantitative Erfassung. Exp. Cell Res. 25, 535-554 (1961)

Gerisch, G.: Spezifische Zellkontakte als Mechanismen der tierischen Entwicklung. Umschau 65, 392-395 (1964)

Gerisch, G., U. Weinhardt, G. Bertholdt, M. Claviez und J.

Stadler: Incomplete contact site A glycoprotein in HL220, a mod B mutant of Dictyostelium discoideum. J. Cell Sci. 73, 49-68 (1985a)

Gerisch, G., J. Hagmann, P. Hirth, C. Rossier, U. Weinhart und M. Westphal: Early Dictyostelium development bypassed by sequential mutagenesis. Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 50, 813-822 (1985b)

Gibson, R., S. Schlesinger und S. Kornfeld: The nonglycosylated glycoprotein of vesicular stomatitis virus is temperature-sensitive and undergoes intracellular aggregation at elevated temperatures. J. Biol. Chem. 254, 3600-3607 (1979)

Gibson, R., S. Kornfeld und S. Schlesinger: A role for oligosaccharides in glycoprotein biosynthesis. TIBS 5, 290-293 (1980)

Gilman, P.B., P. Keane und J. Martinez: The role of the carbohydrate moiety in the biologic properties of fibrinogen. J. Biol. Chem. 259, 3248-3253 (1984)

Gilkes, N.R. und G. Weeks: The purification and characterization of Dictyostelium membranes. Biochim. Biophys. Acta 464, 142-156 (1977)

Goldstein, J.L., R.G.W. Anderson, M.S. Brown: Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. Nature 279, 679-685 (1979)

Green, E.D., J. Gruenebaum, M. Bielinska, J.U. Baenziger und I. Boime: Sulfation of lutropin oligosaccharides with cell-free system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5320-5324 (1984)

Grinna, L.S. und P.W. Robbins: Glycoprotein biosynthesis: Rat liver microsomal glycosidases which process oligosaccharides. J. Biol. Chem. 254, 8814-8818 (1979)

Hannig, K.: New aspects in preparative and analytical continuous free-flow electrophoresis. *Elektrophoresis* 3, 235-243 (1982)

Hanover, J.A. und W.J. Lennarz: Transmembrane assembly of membrane and secretory glycoproteins. *Arch. Biol. Biophys.* 211, 1-19 (1981)

Havinga, J.R., G.J. Strous und C. Poort: Intracellular transport of the major glycoprotein of zymogen granule membranes in the rat pancreas. *Eur. J. Biochem.* 144, 177-183 (1984)

Herrler, G. und R.W. Compans: Posttranslational modification and intracellular transport of mumps virus glycoproteins. *J. Virol.* 47, 354-362 (1983)

Hickman, S. und S. Kornfeld: Effect of tumicamycin on IgM, IgA and IgG secretion by mouse plasmacytoma cells. *J. Immunol.* 121, 990-996 (1978)

Hilz, H. und F. Lipmann: The enzymatic activation of sulfate. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* 41, 880-890 (1955)

Hirano, T., H. Yamada und T. Miyazaki: Cross-reactivity of contact site A to antibody produced against a stage-specific antigen from a phenol/water extract of *Dictyostelium discoideum*. *J. Biochem.* 95, 1355-1366 (1984)

Hirano, T., H. Yamada und T. Miyazaki: Direct implication of surface mannosyl residues in cell adhesion of *Dictyostelium discoideum*. *J. Biochem.* 98, 199-208 (1985)

Humphreys, S., T. Humphreys, J. Sano: Organisation and polysaccharides of sponge aggregation factor. *J. Supramol. Struct. Cell. Biochem.* 7, 339-351 (1977)

Huttner, W. B.: Sulphation of tyrosine residues - a

widespread modification of proteins. *Nature* 299, 273-276 (1982)

Huttner, W.B.: Determination and occurrence of tyrosine O-sulfate in proteins. *Methods Enzymol.* 107, 200-223 (1984)

Huttner, W.B. und P.A. Bäuerle: Sulfation of proteins on tyrosine. In: *Modern Cell Biology*, ed. B.H. Satyr (Alan R. Liss Inc., New York) in press (1986)

Hyafil, F., D. Morello, C. Babinet und F. Jacob: A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell* 21, 927-934 (1980)

Itoh, K. und K. Kumagai: Effect of tunicamycin and neuramidase on the expression of Fc-IgM and -IgG receptors on human lymphocytes. *J. Immunol.* 124, 1830-1836 (1980)

Ivatt, R.J., O.P. Das, E.J. Henderson und P.W. Robbins: Developmental regulation of glycoprotein biosynthesis in *Dictyostelium*. *J. Supramol. Struct. Cell. Biochem.* 17, 359-368 (1981)

Ivatt, R.J., O.P. Das, E.J. Henderson und P.W. Robbins: Glycoprotein biosynthesis in *Dictyostelium discoideum*: Developmental regulation of the protein-linked glycans. *Cell* 38, 561-567 (1984)

Kaufman, J.F., C. Auffray, A.J. Korman, D.A. Shackelford und J. Strominger: The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell* 36, 1-13 (1984)

Kornfeld, R. und S. Kornfeld: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 631-664 (1985)

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)

Lam, T.-Y. und C.-H. Siu: Inhibition of cell differentiation and cell cohesion by tunicamycin in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* 92, 398-407 (1982)

Lechner, J., F. Wieland und M. Sumper: Biosynthesis of sulfated saccharides N-glycosidically linked to the protein via glucose. *J. Biol. Chem.* 260, 860-866 (1985)

Lee, R.W.H. und W.B. Huttner: Tyrosine-O-sulfated proteins of PC12 pheochromocytoma cells and their sulfation by a tyrosylprotein sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 258, 11326-11334 (1983)

Lee, R.W.H. und W.B. Huttner: (Glu⁶², Ala³⁰, Tyr⁸) serves as high-affinity substrate for tyrosylprotein sulfotransferase: A Golgi enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 6143-6147 (1985)

Lehle, L., E. Bause: Primary structural requirements for N- and O-glycosylation of yeast mannoproteins. *Biochem. Biophys. Acta*, 799, 246-251, (1984)

Loh, Y.P. und H. Gainer: The role of glycosylation on the biosynthesis, degradation and secretion of the ACTH-lipotropin common precursor and its peptide products. *FEBS Lett.* 96, 269-272 (1978)

Loomis, W.: Developmental regulation of α -mannosidase in *Dictyostelium discoideum*. *J. Bacteriology* 103, 375-381 (1970)

Low, M.G. und P.W. Kincade: Phosphatidylinositol is the membrane-anchoring domain of the Thy-1 glycoprotein. *Nature* 318, 62-64 (1985)

Low, M.G., M.A.J. Ferguson, A.H. Futerman und I. Silman:

Covalently attached phosphatidylinositol as a hydrophobic anchor for membrane proteins. *TIBS* 11, 212-215 (1986)

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)

Malchow, D., B. Nägele, H. Schwarz und G. Gerisch: Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* 28, 136-142 (1972)

Marshall, R.D.: Glycoproteins. *Ann. Rev. Biochem.* 41, 673-702 (1972)

Marshall, R.D.: The nature and metabolism of the carbohydrate-peptide linkages of glycoproteins. *Biochem. Soc. Symp.* 40, 17-26 (1974)

McDonald, C.H. und J. Sampson: The effects of inhibition of protein glycosylation on the aggregation of *Dictyostelium discoideum*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 78, 229-248 (1982)

Melchers, F.: Biosynthesis, intracellular transport, and secretion of immunoglobulins. Effect of 2-deoxy-D-glucose in tumor plasma cells producing and secreting immunoglobulin G1. *Biochem.* 12, 1471-1476 (1973)

Merkle, R.K. und A. Heifetz: Enzymatic sulfation of N-glycosidically linked oligosaccharides by endothelial cell membranes. *Arch Biochem. Biophys.* 234, 460-467 (1984)

Meyer, D.I., E. Krause und B. Dobberstein: Secretory protein translocation across membranes - The role of the 'docking protein'. *Nature* 297, 647-650 (1982)

Miller, R.R. und C.J. Waechter: Enzymatic sulfation of a large molecular weight glycoprotein associated with pig

brain membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 198, 31-41 (1979)

Mierendorf, R. C., J. A. Cardelli und R. L. Dimond: Pathways involved in targeting and secretion of a lysosomal enzyme in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* 100, 1777-1787 (1985)

Moscona, A.A. und R.E. Hausmann: Biological and biochemical studies on embryonic cell-cell recognition. In: *Cell and Tissue Interactions*. eds. Lash, J.W. und M.M. Burger (Raven Press, New York) pp. 173-185 (1977)

Müller, K. und G. Gerisch: A specific glycoprotein as the target site of adhesion blocking Fab in aggregating *Dictyostelium discoideum* cells. *Nature* 274, 445-449 (1978)

Müller, K., G. Gerisch, I. Fromme, H. Mayer und A. Taubitz: A membrane glycoprotein of aggregating *Dictyostelium* cells with the properties of contact sites. *Eur. J. Biochem.* 99, 419-426 (1979)

Murray, B.A., L.D. Yee und W.F. Loomis: Immunological analysis of a glycoprotein (contact sites A) involved in intercellular adhesion of *Dictyostelium discoideum*. *J. Supramol. Struct. Cell. Biochem.* 17, 197-211 (1981)

Murray, B.A., H.L. Niman und W.F. Loomis: Monoclonal antibody recognizing gp80, a membrane glycoprotein implicated in intercellular adhesion of *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell. Biol.* 3, 863-870 (1983)

Murray, B.A., S. Wheeler, T. Jongens und W.F. Loomis: Mutations affecting a surface glycoprotein, gp80, of *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell. Biol.* 4, 514-519 (1984)

Neuberger, A., A. Gottschalk, R.D. Marshall und R.G. Spiro: Carbohydrate-peptide linkages in glycoproteins and methods for their elucidation. In: *Glycoproteins*, ed. A. Gottschalk (Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York) pp. 450-490 (1972)

Neufeld, E.F. und G. Ashwell: Carbohydrate recognition for receptor-mediated pinocytosis. In: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, ed. Lennarz, W. (Plenum Press, New York) pp. 241-266 (1980)

Noegel, A., C. Harloff, P. Hirth, R. Merkl, M. Modersitzki, J. Stadler, U. Weinhart, M. Westphal und G. Gerisch: Probing an adhesion mutant of Dictyostelium discoideum with cDNA clones and monoclonal antibodies indicates a specific defect in the contact site A glycoprotein. EMBO J. 4, 3805-3810 (1985)

Noegel, A., G. Gerisch, J. Stadler und M. Westphal: Complete sequence and transcript regulation of a cell adhesion protein from aggregating Dictyostelium cells. EMBO J. in press (1986)

Ochiai, H., H. Schwarz, R. Merkl, G. Wagle und G. Gerisch: Stage-specific antigens reacting with monoclonal antibodies against contact sites A, a cell-surface glycoprotein of Dictyostelium discoideum. Cell Differ. 11, 1-13 (1982a)

Ochiai, H., J. Stadler, M. Westphal, G. Wagle, R. Merkl und G. Gerisch: Monoclonal antibodies against contact sites A of Dictyostelium discoideum: detection of modifications of the glycoprotein in tunicamycin-treated cells. EMBO J. 1, 1011-1016 (1982b)

O'Farrell, P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007-4021 (1975)

Olden, K., J.B. Parent und S.L. White: Carbohydrate moieties of glycoproteins: a re-evaluation of their function. Biochimica et Biophysica Acta 650, 209-232 (1982)

Olden, K., B.A. Bernard, M.J. Humphries, T.-K. Yeo, K.-T. Yeo, S.L. White, S.A. Newton, H.C. Bauer und J.B. Parent: Function of glycoprotein glycans. Trends Biochem. Sci. 10, 78-82 (1985)

Onishi, H.R., J.S. Tkacz und J.O. Lampen: Glycoprotein nature of yeast alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* 254, 11943-11952 (1979)

Pearse, B.M.F. und M.S. Bretscher: Membrane recycling by coated vesicles. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 85-101 (1981)

Plummer, T.H., J.H. Elder, S. Alexander, A.W. Phelan und A.L. Tarentino: Demonstration of peptide: N-glycosidase F activity in endo- β -N-acetylglucosaminidase F preparations. *J. Biol. Chem.* 259, 10700-10704 (1984)

Roller, R.J. und P.M. Wassarman: Role of asparaginelinked oligosaccharides in secretion of glycoproteins of the mouse egg's extracellular coat. *J. Biol. Chem.* 258, 13243-13249 (1983)

Rosenbusch, J.P., R.M. Garavito, D.L. Dorset und A. Engel: Structure and function of a pore-forming transmembrane protein: high resolution studies of a bacterial porin. In: *Protides of the biological fluids*, 29th Colloquium 1981, ed. H. Peeters (Pergamon Press, Oxford and New York), pp. 171-174 (1982)

Roth, S.A., J.A. Weston: The measurement of intercellular adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 974-980 (1967)

Roth, T.F. und K.R. Porter: Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes Aegypti*. *L. J. Cell Biol.* 20, 313-332 (1964)

Schmidt, J.A. und W.F. Loomis: Phosphorylation of the contact site A glycoprotein (gp80) of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* 91, 296-304 (1982)

Seki, T., H.-C. Chang, T. Moriuchi, R. Denome, H. Ploegh und J. Silver: A hydrophobic transmembrane segment at the carboxyl terminus of Thy-1. *Science* 227, 649-651 (1985)

Sidman, C., M.J. Potash und G. Köhler: Roles of protein and carbohydrate in glycoprotein processing and secretion. *J. Biol. Chem.* 256, 13180-13187 (1981)

Siu, C.-H., T.Y. Lam und A.H.C. Choi: Inhibition of cell-cell binding at the aggregation stage of Dictyostelium discoideum development by monoclonal antibodies directed against an 80,000-Dalton surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 260, 16030-16036 (1985)

Springer, W.R., P.L. Haywood und S.H. Barondes: Endogenous cell surface lectin in Dictyostelium: Quantitation, elution by sugar, and elicitation by divalent immunoglobulin. *J. Cell Biol.* 87, 682-690 (1980)

Solyom, A. und E.G. Trams: Enzyme markers in characterization of isolated plasma membranes. *Enzyme* 13, 329-372 (1972)

Stadler, J., G. Gerisch, G. Bauer, C. Suchanek und W.B. Huttner: In vivo sulfation of the contact site A glycoprotein of Dictyostelium discoideum. *EMBO J.* 2, 1137-1143 (1983)

Stadler, J., G. Bauer und G. Gerisch: Acylation in vivo of the contact site A glycoprotein and of other membrane proteins in Dictyostelium discoideum. *FEBS Lett.* 172, 326-330 (1984)

Steinemann, C. und R.W. Parish: Evidence that a developmentally regulated glycoprotein is target of adhesion-blocking Fab in reaggregating Dictyostelium. *Nature* 286, 621-623 (1980)

Tabas, I. und S. Kornfeld: Biosynthetic intermediates of β -glucuronidase contain high mannose oligosaccharides with blocked phosphate residues. *J. Biol. Chem.* 255, 6633-6639 (1980).

Takatsuki, A., K. Arima und G. Tamura: Tunicamycin, a new

antibiotic: Isolation and characterisation of Tunicamycin. J. Antibiotics 24, 215-223 (1971a)

Takatsuki, A. und G. Tamura: Effect of tunicamycin on synthesis of macromolecules in cultures of chick-embryo fibroblasts infected with newcastle disease virus. J. Antibiotics 24, 785-794 (1971b)

Townes, P. und J. Holtfreter: Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. J. Exp. Zool. 128, 53-120 (1955)

Ungewickell, E. und D. Branton: Assembly units of clathrin coats. Nature 289, 420-422 (1981)

Vaessen, R. Merkle, J. Kreike, G.S.P. Groot: Protein transfer to nitrocellulose filters. FEBS Lett. 124, 193-196 (1981)

Wallraff, E., M. Schleicher, M. Modersitzki, D. Rieger, G. Isenberg und G. Gerisch: Selection of Dictyostelium mutants defective in cytoskeletal proteins: use of an antibody that binds to the ends of α -actinin rods. EMBO J. 5, 61-67 (1986)

Walter, P. und G. Blobel: Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. J. Cell Biol. 91, 557-561 (1981)

West, C.M. und W.F. Loomis: Absence of carbohydrate modification does not affect the level or subcellular localization of three membrane glycoproteins in modB mutants of Dictyostelium discoideum. J. Biol. Chem. 260, 13803-13809 (1985)

Willadsen, P. und M. Sumper: Sulphation of a cell surface glycoprotein from Volvox carteri. FEBS Lett. 139, 113-116 (1982)

Williams, A.F. und A.G.-D. Tse: A glycopospholipid covalently attached to the C-terminus of the Thy-1 glycoprotein. Bioscience Reports 5, 999-1005 (1985)

Wilson, H.V.: On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. J. Exp. Zool. 5, 245 (1907)

Wood, L. und A. Kaplan: Transit of α -mannosidase during its maturation in Dictyostelium discoideum. J. Cell Biol. 101, 2063-2069 (1985)

Yamada, H., T. Hirano, T. Miyazaki, A. Takatsuki und G. Tamura: Effects of tunicamycin on cell adhesion and biosynthesis of glycoproteins in aggregation competent cells of Dictyostelium discoideum. J. Biochem. 92, 399-406 (1982)

Yoshida, M., J. Stadler, G. Bertholdt und G. Gerisch: Wheat germ agglutinin binds to the contact sites A glycoprotein of Dictyostelium discoideum and inhibits EDTA-stable cell adhesion. EMBO J. 3, 2663-2670 (1984)

Yost, C.S., J. Hedgpeth und V.R. Lingappa: A stop transfer sequence confers predictable transmembrane orientation to a previously secreted protein in cell-free systems. Cell 34, 759-766 (1983)

LEBENS LAUF

Name	Hans-Peter Hohmann
geboren	3. 6. 1955 in Künzell/Fulda
Eltern	Anton Hohmann, Landwirt Irmgard Hohmann, geb. Mihm
1961-1965	Don-Bosco-Schule, Künzell
1965-1974	Rabanus-Maurus-Schule, Fulda
1974	Abitur
1974-1976	Wehrdienst
1976-1979	Studium der Chemie an der Universität Marburg und Diplomvorprüfung
1979-1981	Studium der Chemie an der Universität Heidelberg und Diplomprüfung
1981-1983	Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. J. Knappe am Institut für biologische Chemie der Universität Heidelberg
1983-1986	Anfertigung der Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. G. Gerisch am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

